

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW
I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Number 76

Numer 76

Volume XI

Rok XI

DECEMBER 2008

GRUDZIEŃ 2008

ISSN 1429-7248

PUBLISHER:

WYDAWCA:

**Polish Society
for Biomaterials
in Cracow**

Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

**EDITORIAL
COMMITTEE:**

KOMITET
REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief

Redaktor naczelny
Jan Chłopek

Editor

Redaktor
Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial

Sekretarz redakcji
Katarzyna Trała

Design

Projekt
Augustyn Powroźnik

**ADDRESS OF
EDITORIAL OFFICE:**

ADRES REDAKCJI:

AGH-UST

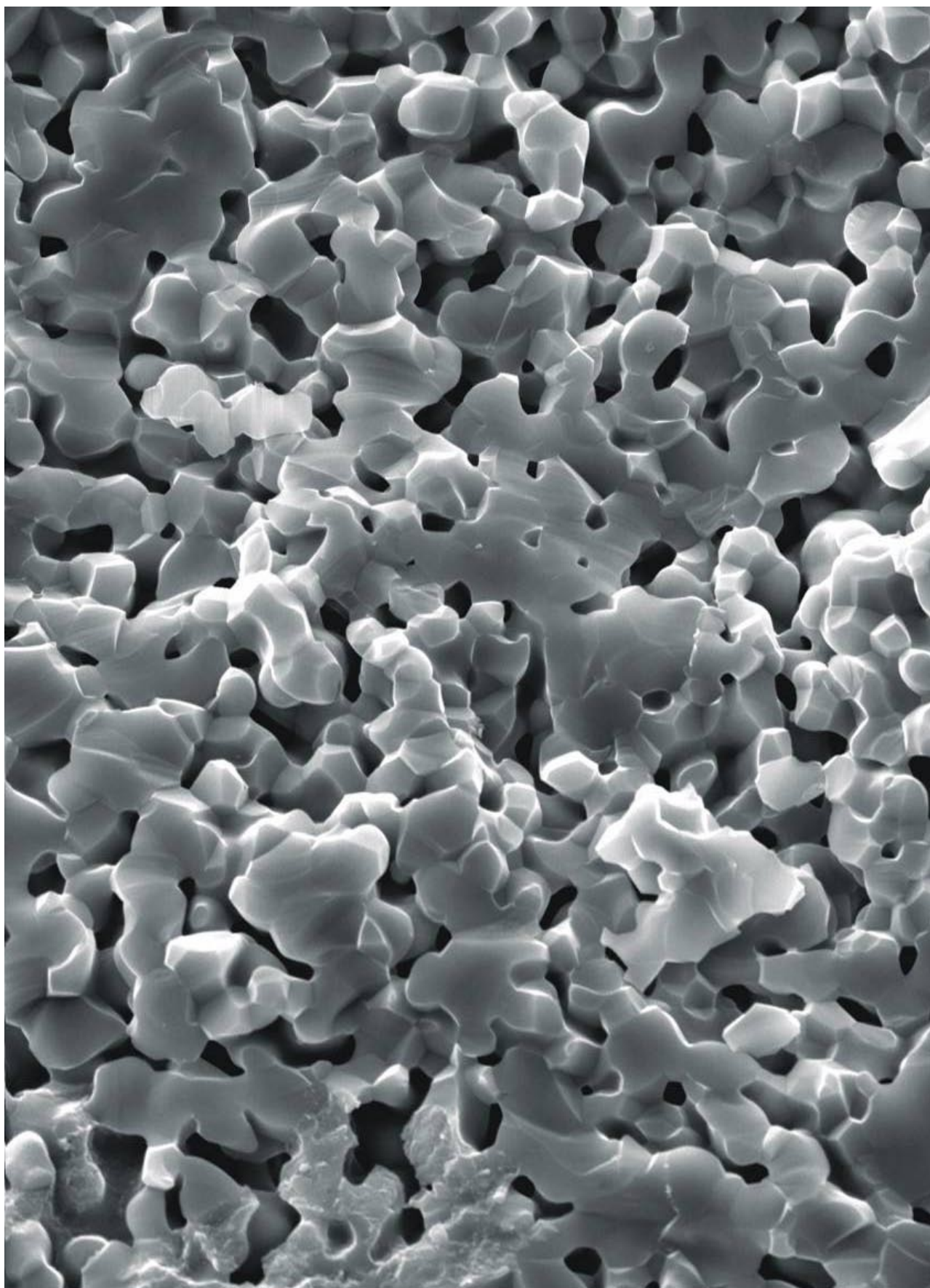
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Cracow, Poland
Akademia
Górnictwo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30/A-3
30-059 Kraków

Issue: 200 copies

Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe
AKAPIT
e-mail: wn@akapit.krakow.pl



INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac
UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

Lucie Bacakova
ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Romuald Bedziński
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Marta Błażewicz
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Stanisław Błażewicz
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Maria Borczuch-Łączka
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Tadeusz Cieślik
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

Jan Ryszard Dąbrowski
POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA / BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

Andrzej Górecki
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Robert Hurt
BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick
JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Wojciech Maria Kuś
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Małgorzata Lewandowska-Szumieł
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Jan Marciniak
POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Sergey Mikhailovsky
UNIVERSITY OF BRIGHTON, GREAT BRITAIN

Stanisław Mitura
POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ

Roman Pampuch
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Stanisław Pielka
AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

Jacek Składzień
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW /
JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, CRACOW

Anna Ślósarczyk
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Tadeusz Trzaska
AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

Dimitris Tsipas
ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcojęzyców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane*.
(*Prace nierecenzowane, w tym materiały konferencyjne, będą drukowane w numerach specjalnych pod koniec roku kalendarzowego.)
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres redakcji na płytach CD wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć, lub na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl
4. Struktura artykułu:
• TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach. Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38
tel./fax: (48 12) 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl
www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres:
apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41
Konto:
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
Bank Śląski S.A. O/Kraków,
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001
Opłaty: Cena 1 numeru wynosi 20 PLN

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly magazine „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed*.
(* Non-reviewed articles, including conference materials, will be printed in special issues at the end of the year.)
3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office on CD with a printout, drawings and photos or by e-mail to kabe@agh.edu.pl
4. A manuscript should be organized in the following order:
• TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...
6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
7. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our magazine.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.
11. Manuscripts should be submitted for publication to:

Journal
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
AGH University of Science and Technology
Faculty of Materials Science and Ceramics
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Cracow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38
tel./fax: (48 12) 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl
www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates:
Cost of one number: 20 PLN
Payment should be made to:
Polish Society for Biomaterials
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Cracow, Poland
Bank Slaski S.A. O/Krakow
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

SPIS TREŚCI

BADANIE CYTOTOKSYCZNOŚCI I ODPOWIEDZI TKANKOWEJ NOWYCH ELASTOMEROWYCH TERPOLI(ESTRO-ETERO-ESTRÓW) (TEEE) P. PROWANS, M. EL FRAY, P. ZDEBIAK, P. JAKSZUK, M. MASIUK	2
BADANIA KINETYKI UWALNIANIA LEKU Z IMPLANTÓW BIOCERAMICZNYCH W WARUNKACH <i>IN VITRO</i> Z ZASTOSOWANIEM MODELI MATEMATYCZNYCH B. MYCEK, A. ZIMA, J. SZYMURA-OLEKSIK, A. ŚLÓSARCZYK, A. KRUPA	6
RUSZTOWANIA HYDROKSYAPATYTOWE DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH WYKONANE METODĄ "ROBOCASTING" – WSTĘPNE TESTY K. GRYŃ, J. CHŁOPEK	13
STUDY ON MECHANICAL ASPECTS OF THE STRUCTURAL MODIFICATION OF ϵ -POLYCAPROLACTONE WITH THE WOLLASTONITE NANOPARTICLES J. PODPORSKA, E. SOŁTYSIAK, M. BŁAŻEWICZ	17
HYBRID CARBON LAYERS FOR MEDICAL APPLICATION D. NOWAK, P. NIEDZIELSKI	20
CHARAKTERYZACJA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH WARSTW WĘGLOWYCH NA UHDPE D. BATORY, J. GRABARCZYK, W. KACZOROWSKI	24
OCENA STANU BIŻUTERII METALICZNEJ Z POWŁOKĄ WĘGLOWĄ W BADANIACH <i>IN VIVO</i> D. BOCIĄGA	28

STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS
ABSTRACTED IN APPLIED MECHANICS REVIEWS

CONTENTS

INVESTIGATIONS OF CYTOTOXICITY AND TISSUE RESPONSE TO NEW TERPOLY(ESTER-ETHER- ESTER) ELASTOMERS (TEEE) P. PROWANS, M. EL FRAY, P. ZDEBIAK, P. JAKSZUK, M. MASIUK	2
<i>IN VITRO</i> STUDIES OF THE KINETICS OF DRUG RELEASE FROM BIOCERAMIC IMPLANTS USING MATHEMATICAL MODELS B. MYCEK, A. ZIMA, J. SZYMURA-OLEKSIK, A. ŚLÓSARCZYK, A. KRUPA	6
HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS BY "ROBOCASTING" FOR MEDICAL APPLICATIONS – PRELIMINARY TESTS K. GRYŃ, J. CHŁOPEK	13
STUDY ON MECHANICAL ASPECTS OF THE STRUCTURAL MODIFICATION OF ϵ -POLYCAPROLACTONE WITH THE WOLLASTONITE NANOPARTICLES J. PODPORSKA, E. SOŁTYSIAK, M. BŁAŻEWICZ	17
HYBRID CARBON LAYERS FOR MEDICAL APPLICATION D. NOWAK, P. NIEDZIELSKI	20
MECHANICAL CHARACTERIZATION OF CARBON-BASED LAYERS ONTO UHDPE D. BATORY, J. GRABARCZYK, W. KACZOROWSKI	24
EVALUATION OF THE SURFACE OF METALLIC JEWELLERY WITH CARBON COATING AFTER <i>IN VIVO</i> TEST D. BOCIĄGA	28

WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ
MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO
EDITION FINANCED BY
THE MINISTER OF SCIENCE AND HIGHER EDUCATION

BADANIE CYTOTOKSYCZNOŚCI I ODPOWIEDZI TKANKOWEJ NOWYCH ELASTOMEROWYCH TERPOLI(ESTRO-ETERO-ESTRÓW) (TEEE)

PIOTR PROWANS¹, MIROSLAWA EL FRAY^{2*}, PAULINA ZDEBIAK², PAWEŁ JAKSZUK³, MAREK MASIUK⁴

¹ POMORSKA AKADEMIA MEDYCZNA, KLINIKA CHIRURGII OGÓLNEJ I CHIRURGII RĘKI, UL. UNII LUBELSKIEJ 1, 71-252 SZCZECIN

² POLITECHNIKA SZCZECIŃSKA, INSTYTUT POLIMERÓW, ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH, UL. PUŁASKIEGO 10, 70-322 SZCZECIN

³ SPECJALISTYCZNY SZPITAL KLINICZNY IM. A. SOKOŁOWSKIEGO, III ODDZIAŁ ORTOPEDII URAZOWEJ, UL. SOKOŁOWSKIEGO 11, 70-891 SZCZECIN-ZDUNOWO

⁴ POMORSKA AKADEMIA MEDYCZNA, ZAKŁAD PATOMORFOLOGII, POMORSKA AKADEMIA MEDYCZNA, UL. UNII LUBELSKIEJ 1, 71-252 SZCZECIN

* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań cytotoksyczności i odpowiedzi tkankowej nowych elastomerów poli(estrowo-eterowo-estrowych) (TEEE). Materiały te były dodatkowo modyfikowane hydroksyapatytem (HAP). Stwierdzono, że polimery zawierające hydroksyapatyt spiekany (HAP III) wykazują lepszą biogodność komórkową, wpływają na mniejszy odsetek komórek apoptycznych oraz powodują lepszą odbudowę kości w porównaniu do polimeru zawierającego hydroksyapatyt niekalcynowany (HAP I).

[Inżynieria Biomateriałów, 76, (2008), 2-5]

Wprowadzenie

Poszukiwanie nowych materiałów do rekonstrukcji tkanek miękkich i twardych prowadzi do opracowywania materiałów hybrydowych, polimerowo-ceramicznych, łączących zalety poszczególnych komponentów: elastyczność i wytrzymałość polimerów oraz wysoką biogodność ceramiki, które w zależności od rodzaju tkanki, wykazują pożądany profil degradacji, elastyczności lub twardości.

Jednym z komercyjnie dostępnych biomateriałów do rekonstrukcji tkanek jest Polyactive®, będący kopolimerem poli(glikolu etylenowego) (PEG) i poli(tereftalanu butylenu) (PBT), o wzorze strukturalnym jak na RYS. 1.

Polyactive® o zawartości 70% wagowych PEG i 30% wagowych PBT jest biogodnym polimerem [1]. Może być zastosowany jako substytut chrząstki, powięzi w postaci siatki, sztucznej skóry [2] lub materiału do rekonstrukcji kości [3]. Materiał ten ulega szybkiej biodegradacji, dlatego stosowany jako szkielet umożliwia jednocześnie wnikanie komórek kostnych do wnętrza porów polimeru podczas jego degradacji [4,5]. W przypadku zastosowania go do rekonstrukcji kości nie powoduje jej przebudowy, a jedynie stymuluje powstawanie tkanki włóknistej [4].

Alternatywą dla szybko degradującego materiału, takiego jak Polyactive®, który nie zawsze spełnia wymogi stabilności mechanicznej stawiane substytutom wymagającym dłuższego czasu degradacji może być nowy terpoli(estro-etero-ester) (TEEE), zawierający oprócz bloków PEG i PBT,

INVESTIGATIONS OF CYTOTOXICITY AND TISSUE RESPONSE TO NEW TERPOLY(ESTER-ETHER-ESTER) ELASTOMERS (TEEE)

PIOTR PROWANS¹, MIROSLAWA EL FRAY^{2*}, PAULINA ZDEBIAK², PAWEŁ JAKSZUK³, MAREK MASIUK⁴

¹ POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, CLINIC OF GENERAL AND HAND SURGERY, 1 UNII LUBELSKIEJ STR., 71-252 SZCZECIN

² SZCZECIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLYMER INSTITUTE, DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, 10 PUŁASKIEGO STR., 70-322 SZCZECIN

³ CLINIC HOSPITAL, III DIVISION OF CASUALTY DEPARTMENT, 11 SOKOŁOWSKIEGO STR., 70-891 SZCZECIN-ZDUNOWO

⁴ POMERANIAN MEDICAL UNIVERSITY, DIVISION OF PATHOMORPHOLOGY, 1 UNII LUBELSKIEJ STR., 71-252 SZCZECIN

* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

Summary

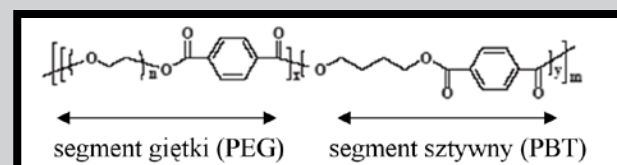
In this work, the results of cytotoxicity and tissue response to new terpoly(ester-ether-ester) (TEEE) elastomers are presented. The materials were additionally modified with hydroxyapatite. It has been found that polymers containing sintered hydroxyapatite (HAP III) showed better cell compatibility and induced lower number of apoptotic cells with simultaneous better bone regeneration as compared to polymers with non-calcined hydroxyapatite (HAP I).

[Engineering of Biomaterials, 76, (2008), 2-5]

Introduction

Development of new materials for soft and hard tissue reconstruction leads to preparation of hybrid polymer-ceramic materials, bringing together advantages of single components: elasticity and strength of polymers with excellent biocompatibility of ceramics, and depending from the type of tissue, they show desired profile of degradation, elasticity or hardness.

One of commercially available biomaterials for tissue reconstruction is Polyactive®, a segmented copolymer of poly(ethylene glycol) (PEG) with poly(ethylene terephthalate) (PBT), with a structure as depicted in FIG. 1.



RYS. 1. Wzór strukturalny multiblokowego kopolimeru PEG/PBT.

FIG. 1. Chemical structure of PEG/PBT copolymer.

Polyactive® containing 70wt% PEG and 30wt% PBT shows good biocompatibility [1]. It can be used as cartilage substitute, surgical mesh, artificial skin [2] or material for bone reconstruction [3]. Polyactive® degrades rapidly therefore if used as a scaffold, it enables penetration of bone cells into material's pores during subsequent degradation [4,5].

hydrofobowy blok zbudowany z estru dimeryzowanego kwasu tłuszczowego, zwanego kwasem dlinoleinowym (DLA) [6]. Dodatkowo, modyfikacja TEEE nanometrycznym hydroksyapatytem [7], pozwala otrzymać materiały hybrydowe o doskonałych właściwościach mechanicznych i kontrolowanej biodegradacji.

Celem pracy było zbadanie biogodności komórkowej i odpowiedzi tkankowej nowych terpolimerów i materiałów hybrydowych.

Materialy

Do badań wykorzystano nowe terpoli(estro-etero-estry) o zawartości 45% wagowych segmentów sztywnych PBT, 19% wagowych segmentów giętkich tworzonych przez DLA i 36% wagowych segmentów giętkich tworzonych przez PEG o ciężarze cząsteczkowym 1000 Da [6]. Zsyntezowano polimer bez stabilizatora termicznego (TEEE) oraz zawierający witaminę E jako stabilizator (TEEE/VE). Do polimerów TEEE wprowadzono na drodze polikondensacji *in situ* ceramikę hydroksyapatytową w ilości 0,5% wag. Użyto hydroksyapatyt niekalcynowany (HAP I) oraz hydroksyapatyt spiekany (HAP III) [7]. Z syntezowanych polimerów przygotowano cienkie filmy (o grubości 0.5 mm) metodą prasowania na gorąco, z których następnie wycinano krążki i pałeczki o wymiarach podanych w następnym paragrafie.

Metody

Zawiesinę komórek linii 3T3 mysich fibroblastów naniesiono na krążki polimerowe o średnicy 14 mm umieszczone w 26-dółkowych płytkach hodowlanych. Komórki hodowano przez 5 dni (120 godzin) w medium RPMI-1640 w obecności 10% surowicy płodowej bydźlecej, L-glutaminy (0.125 mM), streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 IU/ml) (wszystkie odczynniki z Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) w wilgotności 95%, temperaturze 37°C i stężeniu CO₂ wynoszącym 5%. Po inkubacji żywotność komórek oceniono na cytometrze przepływowym stosując prosty test z jodkiem propydydny. Komórki żywe nie ulegają wybarwieniu (usuwa jodek propydydny z wnętrza), komórki martwe i apoptotyczne barwią się jodkiem propydydny. Proliferyację oceniano licząc komórki na powierzchni polimeru pod mikroskopem odwróconym w 5 dniu trwania doświadczenia. Wynik podawano jako wartość względną w odniesieniu do kontroli w momencie zakładania hodowli (100000 komórek / krążek polimeru / 1 ml pożywki).

Z polimerów wykonano pałeczki o długości 10mm do 12mm, szerokości od 3mm do 5mm oraz grubości od 0,6 mm do 0,8 mm. Próbkę sterylizowano tlenkiem etylenu w sterylizatorze firmy 3M Steri-Vac5. Jako zwierzęta doświadczalne wykorzystano 30 szczurów rasy Wistar płci męskiej o wadze od 200g do 220g. Pierwszej dziesiątce wszczepiono do lewego uda podokostnowo polimer TEEE I. W celu oceny reakcji kości na uraz operacyjny u każdego z tych zwierząt z kości udowej prawej złuszczone okostną bez wszczepiania polimeru. Drugiej dziesiątce wszczepiono do uda lewego polimer TEEE III. Trzeciej dziesiątce szczurów wszczepiono do uda prawego silikon.

Operacje wykonywano wstrzykując domięśniowo preparat ketaminy – Narkamon w dawce 120mg/kg m.c. Po znieczuleniu gołono skórę w okolicy obu ud i nacinano odsłaniając mięśnie, a po ich rozwarstwieniu odsłaniano kość udową. Następnie złuszczano okostną i umieszczano na kości udowej polimer. W celu wszczepienia próbki do mięśni rozwarstwiano na tępo mięsień i wprowadzano do wytworzonej kieszeni pasek polimeru. Ranę zamykano dwoma szwami skórnyimi.

When used in bone tissue engineering, it stimulates formation of fibrous tissue rather than bone remodeling [4].

An alternative to fast-degrading material, such as Polyactive®, which is not always fulfilling the requirements of higher mechanical stability during longer degradation time, can be a new terpoly(ester-ether-ester) (TEEE), containing PEG and PBT as in Polyactive®, and additionally hydrophobic unit containing dimer of unsaturated fatty acid (DLA) [6]. Moreover, modification of such system with nanometer hydroxyapatite [7], allows to obtain hybrid materials with excellent mechanical properties and tailored biodegradation.

The aim of this work was to investigate cell biocompatibility and tissue response of TEEE and hybrid materials.

Materials

New terpoly(ester-ether-ester)s containing 45wt% PBT hard segments, 19wt% DLA soft segments and 36wt% PEG soft segments with a molecular weight 1000Da were used [6]. TEEE without thermal stabilizer and terpolymer containing vitamin E (TEEE/VE) were prepared. Hydroxyapatite ceramic was added into TEEE during *in situ* polycondensation in amount of 0.5wt%. Two different hydroxyapatites were used: non-calcined (HAP I) and sintered (HAP III). Thin polymer films (0.5mm thick) were prepared by hot press and then samples in a form of discs and sticks were cut off.

Methods

The suspension of mouse fibroblast 3T3 cell line was poured on polymer discs in 26-well plates. Cells were cultured for 5 days (120 hours) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine (0.125 mM), streptomycin (100 µg/ml) and penicillin (100 IU/ml) (all chemicals from Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) in 95% humidity, 37°C, 5% CO₂. After the incubation, the viability of cells was assessed by simple, propidium iodide exclusion test. Living cells remove propidium iodide while apoptosis and dead cells do not. Proliferation was assessed by counting cells during observation under an inverted microscope on day 5 of experiment. Results were given as a ratio of cell number in day 5 in relation to number of cells in day 0 equal to 100000 cell / polymer disc / 1 ml of medium.

Small polymer sticks 10 to 12 mm long, 3 to 5 mm wide, and 0.6 to 0.8 thick were prepared. Samples were EtO sterilized with 3M Steri-Vac5 apparatus. Polymer rods were implanted into 30 Wistar rats weighing 200-220 g. TEEE I polymer was implanted into left thigh subperiosteally into 10 rats. In order to evaluate bone response to surgical procedure, the periosteum was peel out from the right thigh. TEEE III polymer was implanted into next 10 rats in a similar way. Silicone elastomer was implanted into third group of rats.

Surgical procedure was performed with the use of ketamine (Narkomon) injections at dose of 120 mg/kg of b.w. Animal observations were performed for 180 days, and then sacrificed with sodium pentobarbital in amount 200 mg/kg b.w. The structure of bone and fibrous capsule were analyzed followed the preparation of tissues with implanted polymers.

Tissue samples were fixed in 10% buffered formaldehyde, decalcified and microscopic slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin. Atrophic changes and osteoblastic reactions were assessed by 12 subsequent measurements of cortical bone. The mean value of bone thickness was calculated. The structure of bone was also analyzed by means of changes of cancellous bone to trabecular bone and callus formation over the implanted polymer sample.

Obserwacje zwierząt kontynuowano przez 180 dni. Po upływie 180 dni zwierzęta uśmiercano podając domięśniowo pentobarbital sodu w dawce 200mg/kg m.c. i pobrano tkanki do badań.

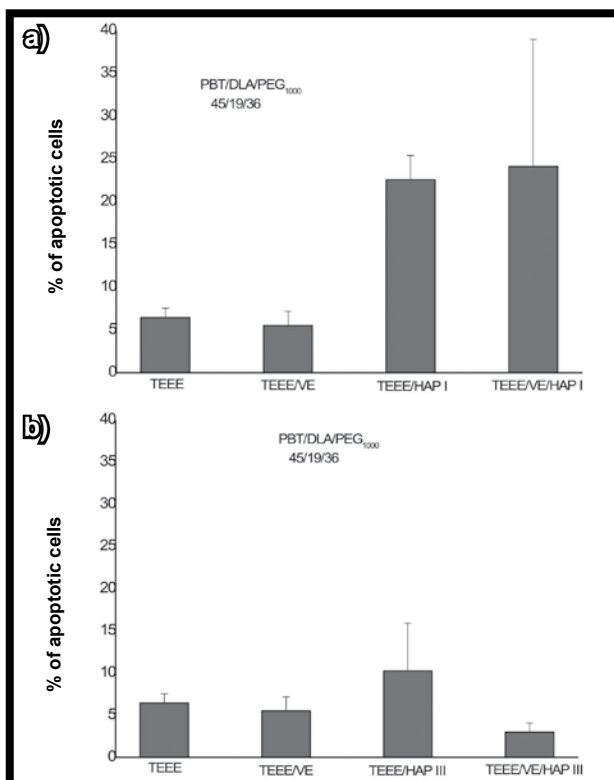
Po wypreparowaniu tkanek razem z wszczepionymi polimerami zbadano wygląd kości poszukując zaników tkanki kostnej. Oceniono wygląd otoczek łącznotkankowych powstałych dookoła wszczepów.

Próbki tkanek z wszczepionymi polimerami utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie, odwapniano a następnie wykonywano z nich preparaty mikroskopowe stosując barwienie hematoksyliną i eozyną (HE). Oceniając tkankę kostną poszukiwano zaników lub pogrubienia kości. Ocenę przeprowadzono wykonując 12 pomiarów grubości kości korowej a następnie obliczano średnią dla danego preparatu. Badano budowę mikroskopową kości zwracając uwagę na powstałe zmiany przejścia kości drobnowłóknistej w kość grubowłóknistą oraz powstałe ogniska kostniny pokrywające wszczep.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań cytotoksyczności nowych polimerów TEEE oraz TEEE zawierających hydroksyapatyt (HAP I i HAP III) przedstawiono na RYS. 2 i 3. Polimer TEEE nie zawierający stabilizatora termicznego wykazał wyższą proliferację komórek w porównaniu do materiału zawierającego VE i dodatkowo zmodyfikowanego HAP I (RYS. 2a). Zastąpienie hydroksyapatytu niekalcynowanego (HAP I) hydroksyapatytem spiekającym (HAP III) spowodowało znaczny wzrost ilości komórek, wskazując na lepszą biogodność komórkową (RYS. 2b).

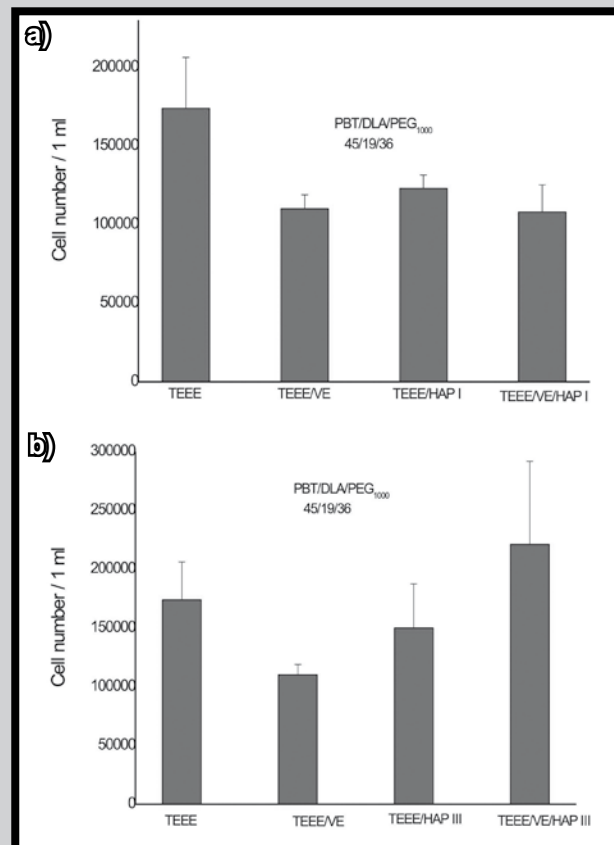
Potwierdzeniem dobrej biogodności polimeru TEEE zawierającego HAP III są również wyniki pomiaru ilości komórek martwych i apoptycznych przedstawione na RYS. 3. Ilość komórek apoptycznych dla tego polimeru nie przekroczyła 5% (RYS. 3b), podczas gdy dla TEEE zawierającego HAP I, ilość komórek martwych i apoptycznych przekroczyła 25% (RYS. 3a).



RYS. 3. Ilość komórek martwych i apoptycznych.
FIG. 3. Number of dead and apoptotic cells.

Results and discussion

The results of cytotoxicity of new TEEE polymers and TEEE modified with hydroxyapatite (HAP I and HAP III) are presented in FIGs. 2 and 3. TEEE polymer synthesized without thermal stabilizer showed higher cell proliferation as compared to TEEE containing VE, and additionally modified with HAP I (FIG. 2a). By changing the type of hydroxyapatite from HAP I to HAP III (sintered HAP), the cell proliferation was significantly higher, thus indicating better cell compatibility (FIG. 2b).

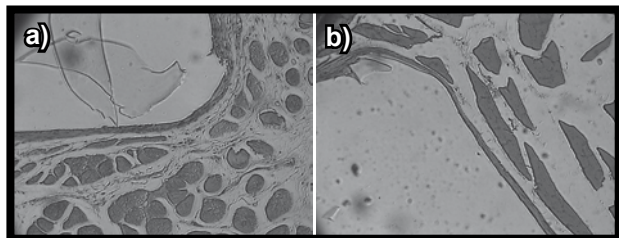


RYS. 2. Wyniki testów cytotoksyczności komórkowej.
FIG. 2. Results of cytotoxicity tests.

Good biocompatibility of TEEE containing HAP III was also confirmed by the results of measurements of dead and apoptotic cells, respectively (FIG. 3). The number of apoptotic cells for this material was not higher as 5% (FIG. 3b), while for TEEE modified with HAP I, the number of dead and apoptotic cells was above 25% (FIG. 3a).

All animals subjected to implantation tests survived well the observation period (no changes in animals' behavior, appearance and activity were noticed). No changes around the soft tissue were detected. Fibrous tissue capsule around implant was thin and weak (FIG. 4). No fluid was detected in a thin a weak capsule.

Thickness of bones and type of changes in its structure was assessed microscopically (TABLE 1). Analysis of the influence of new polymers on thickness and remodeling of bone as well as on amount of fibrous tissue revealed that polymer TEEE III with hydroxyapatite had the best properties.



RYS. 4. Otoczka łącznotkankowa dookoła polimeru zawierającego a) HAP I i b) HAP III (pow. 200x).
FIG. 4. Fibrous capsule around polymer containing: a) HAP I, and b) HAP III (magn. 200x).

Wszystkie zwierzęta poddane testom implantacji przeżyły okres obserwacji. Rany wygoiły się przez rychłozrost. Nie stwierdzono zmian w wyglądzie, zachowaniu i aktywności zwierząt. W ocenie makroskopowej tkanek miękkich nie stwierdzono zmian naciekowych lub zanikowych w otoczeniu wszczepów. Widoczne na przekrojach poprzecznych otoczki łącznotkankowe dookoła polimeru (RYS. 4) były cienkie i wiotkie. Nie stwierdzono obecności płynu w otocze.

W badaniu mikroskopowym oceniono grubość kości oraz rodzaj zmian zachodzących w jej obrębie (TABELA 1). Porównując wpływ nowych polimerów na pogrubienie i przebudowę kości oraz zawartość tkanki łącznej stwierdzono, że najlepszymi właściwościami charakteryzował się TEEE III zawierający hydroksyapatyt spiekany.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że nowe terpolimery o strukturze segmentowej i hydrofilowo-hydrofobowych właściwościach odznaczają się bardzo dobrą biogodnością w stosunku do komórek fibroblastów. Wprowadzenie do struktury polimerów nanocząstek hydroksyapatytu spiekane (HAP III) dało lepsze wyniki biorąc pod uwagę pogrubienie i przebudowę kości w porównaniu do polimeru zawierającego hydroksyapatyt niekalcyonowany (HAP I).

Podziękowania

Autorzy (M. El Fray) dziękują Pani Prof. A. Ślósarczyk (Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica w Krakowie) z próbki hydroksyapatytów.

Piśmiennictwo

- [1] C. Dua, G.J. Meijer, C. van de Valk, R.E. Haan, J.M. Bezemer, S.C. Hesseling, F.Z. Cui, K. de Groot, P. Layrolle: Bone growth in biomimetic apatite coated porous Polyactive 1000 PEGT70PBT30 implants; *Biomaterials* 23 (2002) 4649-4656.
- [2] M. Bezemer, D.W. Grijpma, P.J. Dijkstra, C.A. van Blitterswijk, J. Feijen: A controlled release system for proteins based on poly(ether-ester) block-copolymers: polymer network characterization. *Journal of Controlled Release* 1999, 62, 393-405.
- [3] M. Roessler, A. Wilke, P. Griss, H. Kienapfel: Missing Osteoconductive Effect of a Resorbable PEO/PBT Copolymer in Human Bone Defects: A Clinically Relevant Pilot Study with Contrary Results to Previous Animal Studies; Dept. of Orthopaedic Surgery, Philipps University, 35033 Marburg, Germany.

TABELA 1. Zestawienie wyników pomiaru grubości kości i intensywności wytworzenia tkanki łącznej.
TABLE 1. The results of bone thickness and intensity of bone tissue formation.

Material Material	Grubość kości Bone thickness [mm]	Pogrubienie kości Bone thickening	Przebudo- wa kości* Bone re- modeling*	Tkanka łączna Connective tissue
Zdrowa okostna Healthy bone	0,665	3+/2++	3+	3+/2++
TEEE I	0,641	1+	-	4+/1++
TEEE III	0,657	2+/1++	2+	6+/1+++
Silikon Silicone	0,665	3+	3+	2+/2++/3+++

* Przebudowa: zmiana struktury z kości uporządkowanej drobnowłóknistej, blaszkowatej na kość nieuporządkowaną, grubowłóknistą, splotową (wygląd jak w świeżym zroście kostnym). Oznaczenia: kolejne cyfry oznaczają ilość stwierdzonych przypadków w grupie 10 badanych zwierząt; znaki + odnoszą się do intensywności zmian: + nieznaczne, ++ średnie, +++ intensywne.
 * Remodeling: change of bone structure from oriented and lamellar thin fiber to non-oriented bone with thick fibers. Notations: consequent numbers correspond to the number of animals from the group of 10 animals where changes were detected; symbol + correspond to the intensity of changes: + discrete, ++ moderate, +++ intense.

Conclusions

As presented in results and discussion, new terpolymers of segmented structure and mixed (two component) hard segments showed very good cell proliferation and low percentage of dead and apoptotic cells. Incorporation of sintered hydroxyapatite (HAP III) into polymer structure gave better results for bone remodeling as compared to polymer containing non-calcined HAP I.

Acknowledges

The Authors (M. El Fray) are grateful to Prof. A. Ślósarczyk (AGH in Kraków) for hydroxyapatite samples.

References

- [4] M. Kellomäki, S. Paasimaa, D.W. Grijpma: *In vitro* degradation of Polyactive® 1000PEOT70PBT30 devices. *Biomaterials*, 2002, 23, 283-295.
- [5] A.A. Deschamps, A.A. van Apeldoorn, H. Hayen, J.D. de Bruijn, U. Karst, D.W. Grijpma, J. Feijen: *In vivo* and *in vitro* degradation of poly(ether ester) block copolymers based on poly(ethylene glycol) and poly(butylene terephthalate); *Biomaterials* 25 (2004) 247-258.
- [6] Zdebiak P., El Fray M., Nowe kopolimery amfifilowe. Otrzymywanie i właściwości, *Przemysł Chemiczny*, 2006, (85/8-9), 986-989.
- [7] El Fray M., Zdebiak P., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z., Preparation and selected properties of organic/inorganic composites based on poly(ester-ether-ester) terpolymers and nanocrystalline hydroxyapatite, *Inżynieria Biomateriałów*, 2007, 62, 2-7. Mirkin C.A.: *Nature* 451: 553-556, 2008.

BADANIA KINETYKI UWALNIANIA LEKU Z IMPLANTÓW BIOCERAMICZNYCH W WARUNKACH *IN VITRO* Z ZASTOSOWANIEM MODELI MATEMATYCZNYCH

BEATA MYCEK^{1,A}, ANETA ZIMA^{2,B}, JOANNA SZYMURA-OLEKSIK¹, ANNA ŚLÓSARCZYK², ANNA KRUPA³

¹ ZAKŁAD FARMAKOKINETYKI I FARMACJI FIZYCZNEJ, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET JagIELLOŃSKI, KRAKÓW

^A E-MAIL: MFMYCEK@CYF-KR.EDU.PL

² KATEDRA TECHNOLOGII CERAMIKI I MATERIAŁÓW OGNIOTRWAŁYCH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW

^B E-MAIL: AZIMA@AGH.EDU.PL

³ KATEDRA TECHNOLOGII POSTACI LEKU I BIOFARMACJI, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET JagIELLOŃSKI, KRAKÓW

Streszczenie

W niniejszej pracy badano profil i kinetykę uwalniania leku w warunkach *in vitro* z tabletek o różnym składzie procentowym mieszaniny α TCP–HAp (98% mas. α TCP – 2% mas. HAp; 94% mas. α TCP – 6% mas. HAp; 90% mas. α TCP – 10% mas. HAp) do medium o pH 7.4 oraz z tabletek o takim samym składzie procentowym mieszaniny α TCP–HAp (98% mas. α TCP – 2% mas. HAp) do medium o różnym pH (5, 7.4, 10). Pentoksyfilina (PTX) – lek przyjęty za modelowy został rozmieszczony homogenicznie w implancie bioceramicznym i uwalniał się z dowolnego jego miejsca. Porowatość całkowita badanych biomateriałów wynosiła około 32-38%. Przeprowadzony eksperyment miał również na celu określenie mechanizmu uwalniania PTX z badanych nośników z zastosowaniem modelu Korsenmeyera – Peppasa oraz opis tego procesu za pomocą modelu Higuchiego. Wyniki badań wykazały, że im większy był udział procentowy proszku hydroksyapatytowego w wyjściowym składzie tabletek, tym szybciej zachodziło uwalnianie PTX. Najszybciej lek ten uwalniał się z tabletek α TCP–HAp do medium o pH 5, natomiast najwolniej do środowiska o pH 10. Korzystając z modelu Korsenmeyera – Peppasa określono dla badanych nośników mechanizm uwalniania badanego leku. Otrzymane wartości wykładnika dyfuzyjnego n (charakteryzującego mechanizm uwalniania leku), były równe lub większe od 1, co świadczy o tym, że uwalnianie PTX zachodziło zgodnie z mechanizmem zerowego lub super zerowego rzędu. Na podstawie modelu Higuchiego wyznaczono stałe szybkości uwalniania PTX. Z praktycznego punktu widzenia stała szybkość uwalniania substancji leczniczej utrzymująca się przez dłuższy okres czasu jest pożądana w długotrwałej farmakoterapii.

Słowa kluczowe: implanty bioceramiczne, nośniki leku, modele matematyczne

[Inżynieria Biomateriałów, 76, (2008), 6-12]

IN VITRO STUDIES OF THE KINETICS OF DRUG RELEASE FROM BIOCERAMIC IMPLANTS USING MATHEMATICAL MODELS

BEATA MYCEK^{1,A}, ANETA ZIMA^{2,B}, JOANNA SZYMURA-OLEKSIK¹, ANNA ŚLÓSARCZYK², ANNA KRUPA³

¹ DEPARTMENT OF PHARMACOKINETICS AND PHYSICAL PHARMACY, FACULTY OF PHARMACY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, CRACOW, POLAND

^A E-MAIL: MFMYCEK@CYF-KR.EDU.PL

² DEPARTMENT OF CERAMICS AND REFRACTORY MATERIALS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

^B E-MAIL: AZIMA@AGH.EDU.PL

³ DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS, FACULTY OF PHARMACY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, CRACOW, POLAND

Summary

In the work, profile and kinetics of *in vitro* drug release from the tablets composed of α TCP–HAp mixtures containing various amounts of constituents (98 wt. % α TCP – 2 wt. % HAp; 94 wt. % α TCP – 6 wt. % HAp; 90 wt. % α TCP – 10 wt. % HAp) to the medium of pH = 7.4 as well as from the tablets with constant amounts of α TCP and HAp (98 wt. % α TCP – 2 wt. % HAp) to the media of different pH values (5, 7.4, 10) were studied. Pentoxifylline (PTX), a model drug in the investigations, was distributed homogeneously in the bioceramic implants and released from the whole of their volume. Total porosity of the materials studied was in the range of 32-38%. The aim of the experiment was also to determine the mechanism of PTX release from the carriers using Korsenmeyer – Peppas model as well as to describe this process by Higuchi model. The results showed that the rate of PTX release grew as the proportion of hydroxyapatite powder in the materials increased. The drug release from α TCP–HAp tablets was the fastest into the medium of pH=5 and the slowest into that of pH=10. Using Korsenmeyer – Peppas model the mechanism of the drug release was determined. The values of diffusion exponent n (factor determining the mechanism of drug release) were equal to or higher than 1, which proved that PTX was released according to zero-order or super-zero order mechanism. Based on Higuchi model, the rate constants of the process were calculated. From practical point of view, constant rate of drug release over a long time is desired in the long-term therapy.

Keywords: bioceramic implants, drug carriers, mathematical models

[Engineering of Biomaterials, 76, (2008), 6-12]

W ostatnich latach szczególne zainteresowanie w medycynie i farmacji zyskały biozgodne i bioaktywne fosforanowo-wapniowe materiały implantacyjne (CaPs) wytwarzane w oparciu o ceramikę hydroksyapatytową (HAp) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, whitlockitową (βTCP) – $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ i αTCP – $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Tworzywa te z uwagi na dużą kruchość wykorzystywane są jako materiały wypełniające ubytki tkanki kostnej w miejscach nie przenoszących znacznych obciążeń mechanicznych. Dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym i biologicznym bioceramika fosforanowo-wapniowa od kilku lat badana jest w aspekcie zastosowania jej w docelowych systemach dostarczających leki głównie do kości, tzw. skeletal drug delivery system. Stosowanie materiałów bioceramicznych, zawierających długotrwale uwalniającą się substancję leczniczą, może zapewniać przez dłuższy okres czasu terapeutyczne stężenie leku w miejscu założenia implantu. W konsekwencji prowadzi to do znacznie większej efektywności leczenia w porównaniu z doustnym, a nawet dożylnym podawaniem niektórych leków. Skuteczność terapeutyczna substancji leczniczych zależy nie tylko od ich działania farmakologicznego, ale także od odpowiedniego stężenia w pobliżu receptora, czyli w biofazie [3,4,6]. Stąd stężenie leku we krwi, a pośrednio i w miejscu działania, zależy w znacznym stopniu od sposobu jego dawkowania. Istnieje wiele możliwych dróg podania leku, a dobór właściwej jest ważnym elementem procesu leczenia chorego. Stosowanie biomateriałów jako nośników leków umożliwia kontrolę oraz stabilność uwalniania substancji leczniczej w organizmie. Opracowanie i zastosowanie modeli matematycznych pozwala natomiast na pełne scharakteryzowanie kinetyki uwalniania leku z danego implantu [7]. W ostatnich latach badania w tym zakresie dotyczą takich leków jak: antybiotyki, cytostatyki, niesteroidowe leki przeciwzapalne, hormony i białka. Ilość uwalnianego leku jest funkcją czasu, a szybkość tego procesu i w konsekwencji mechanizm uwalniania zależy od mikrostruktury i składu fazowego biomateriału oraz od właściwości fizykochemicznych substancji leczniczej. Istotną rolę pełni również sposób rozmieszczenia leku w implantcie (układ homogeniczny lub heterogeniczny) [5,13-16]. Podstawowe znaczenie w doborze odpowiedniego modelu matematycznego do profilu uwalniania leku ma zarówno jego postać, jak również sposób inkorporowania w matrycę. Kinetykę procesu uwalniania substancji leczniczej z nośników ceramicznych, w których lek został rozmieszczony homogenicznie można przedstawić za pomocą modelu Higuchiego, opisanego równaniem (1) [8-11]:

$$M_t = A M_0 \left[C_s \left(\frac{D_i \varepsilon}{\tau} \right) (2 C_d - C_s \varepsilon) t \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

zakładając, że:

$$K_H = A M_0 \left[C_s \left(\frac{D_i \varepsilon}{\tau} \right) (2 C_d - C_s \varepsilon) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

otrzymuje się równanie 3:

$$M_t = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

gdzie:

- M_t - ilość uwolnionego leku po czasie t
- M_0 - początkowa ilość leku
- D_i - współczynnik dyfuzji leku
- A - powierzchnia całkowita kształtki (tabletki)
- C_s - rozpuszczalność leku
- C_d - stężenie leku w roztworze
- τ - krętość porów
- ε - porowatość
- t - czas
- K_H - stała Higuchiego

In recent years, biocompatible and bioactive calcium phosphate implant materials (CaPs) based on hydroxyapatite (HAp) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, whitlockite (βTCP) – $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and αTCP – $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ have received particular interest in medicine and pharmacy. Due to their brittleness, these materials are used as fillers of bone tissue losses in the sites not carrying high mechanical loads. Since CaP ceramics exhibit advantageous physico-chemical and biological properties, for several years they have been studied in view of their uses as skeletal drug delivery systems. Application of bioceramic materials from which a sustained drug release occurs, can provide its therapeutic level in the site of implantation for a long time. This results in significantly higher efficiency of the treatment with respect to those in which medical preparations are administered orally or even intravenously. Therapeutic effect of a drug depends not only on its pharmacological action but also on its appropriate concentration in the environment of the receptor, i. e. in the so-called biophase [3,4,6]. Drug levels in the blood and in the target site are influenced to a high degree by the way of its administration. There are numerous ways possible and the choice of the optimum one is an important factor in the treatment process. Use of biomaterials as carriers makes it possible to control and stabilize medicament release into the organism. On the other hand, development and application of mathematical models allows to fully characterize the kinetics of drug release from a given implant [7]. In recent years, investigations in this area are focused on such drugs, as: antibiotics, cytostatics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, hormones and proteins. The amount of the drug released is a function of time, whereas the rate as well as the mechanism of this process depend on the microstructure and phase composition of the biomaterial and on physico-chemical properties of the active substance. The method of drug loading within an implant (homogeneous or heterogeneous system) plays also an important role [5,13-16]. In the selection of the appropriate mathematical model for a given drug release profile, form of the medicament as well as the way of its incorporation in the matrix are the most significant factors which should be taken into account. Kinetics of the drug release from ceramic carriers with homogeneous drug distribution can be described using Higuchi model by equation (1) [8-11]:

$$M_t = A M_0 \left[C_s \left(\frac{D_i \varepsilon}{\tau} \right) (2 C_d - C_s \varepsilon) t \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

Assuming that:

$$K_H = A M_0 \left[C_s \left(\frac{D_i \varepsilon}{\tau} \right) (2 C_d - C_s \varepsilon) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

equation (3) is obtained:

$$M_t = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

where:

- M_t - amount of the drug released after time t
- M_0 - initial drug amount
- D_i - drug diffusion coefficient
- A - total area of the formulation (tablet)
- C_s - drug solubility
- C_d - drug concentration in the solution
- τ - tortuosity of pores
- ε - porosity
- t - time
- K_H - Higuchi constant

Jak wynika z powyższego równania ilość uwolnionej substancji jest funkcją pierwiastka kwadratowego z czasu. Zgodnie z modelem Higuchiego proces dyfuzji leku przez pory jest czynnikiem kontrolującym uwalnianie leku z biomateriału. Szybkość procesu uwalniania leku w tego typu układzie w początkowym okresie jest wysoka, następnie maleje i pozostaje stała przez pewien okres czasu.

Mechanizm uwalniania leku z implantu może być także opisany równaniem zaproponowanym przez Korsenmeyera i Peppasa, które dla układu homogenicznego przyjmuje postać (4) [1,2,7]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (4)$$

gdzie:

M_t - ilość uwolnionego leku po czasie t

M_∞ - początkowa ilość leku

K - stała szybkości

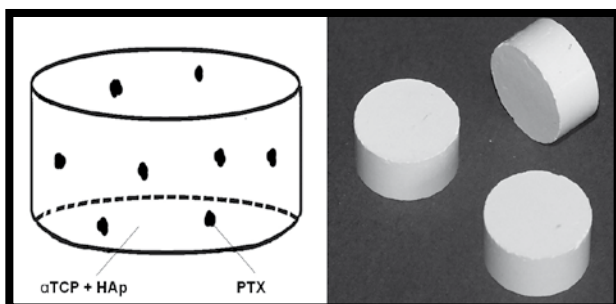
t - czas

n - wykładnik dyfuzyjny

Równanie to jest słuszne przy założeniu, że analiza kinetyki procesu obejmuje czas, w którym uwolnione zostało 60% substancji. Wartość wykładnika n może być stosowana do scharakteryzowania zarówno penetracji rozpuszczalnika przez pory biomateriału jak i uwalniania leku. Peppas zaproponował, że dla $n = 0.5$ kinetyka uwalniania leku zachodzi zgodnie z kinetyką dyfuzji wg Ficka (Fickian diffusion), a dla $0.5 < n < 1$ ma charakter anomalny (anomalous transport) i jest różny od dyfuzji Ficka. Dla wartości $n = 1$ stanowi szczególny przypadek, w którym mechanizm transportu uwalniania zmierza do zerowego rzędu i określony został w piśmiennictwie jako przypadek II (case II transport), natomiast dla $n > 1$ określany jest jako super zerowego rzędu (super case II transport) [12].

Materialy i metody

Do wytworzenia tabletek jako nośników leków wykorzystano: ortofosforan (V) wapnia (α TCP) – $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ oraz hydroksyapatyt (HAp) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Wyjściowe proszki otrzymano metodą moką w Katedrze Technologii Ceramiki i Materiałów Ogniotrwałych WIMiC Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Skład fazowy proszków określono za pomocą analizy rentgenowskiej przeprowadzonej przy użyciu dyfraktometru rentgenowskiego X'Pert Pro firmy Philips. Tabletki (RYS. 1) składające się z 1 g mieszaniny α TCP i HAp (TABELA 1), 50 mg PTX oraz 0.6 ml 3% roztworu Na_2HPO_4 wykonano w tabletkarce uderzeniowej Erweka z siłą kompresji 35 kN. Pole czynnej powierzchni uwalniania leku w tabletkach wynosiło 4.55 cm^2 . Porowatość całkowita badanych próbek wynosiła od 32 do 38%. Otrzymane w ten sposób tabletki stanowiły układ homogeniczny (lek równomiernie rozproszony w całej masie tabletki uwalniał się z dowolnego jej miejsca).



RYS. 1. Ceramiczne nośniki leku α TCP–HAp.
FIG. 1. Ceramic α TCP–HAp drug carriers.

From the above equation it follows that the amount of the drug released is a function of square root of time. According to Higuchi model, drug release from the biomaterial is controlled by its diffusion through the pores of the carrier. The rate of the release process in such system is high in the initial period, then it decreases and remains constant for some time.

Mechanism of drug release from the implant can be also described using the equation proposed by Korsenmeyer and Peppas, which for the homogeneous system is given by expression (4) [1,2,7]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (4)$$

where:

M_t - amount of the drug released after time t

M_∞ - initial drug amount

K - rate constant

t - time

n - diffusion exponent

This equation is valid when the kinetics of the process within the time period during which 60% of the active substance has been released is considered. Value of exponent n can be used to characterize both, solvent penetration through the pores of the biomaterial and drug release. According to Peppas, for $n = 0.5$ kinetics of drug release follows that of Fickian diffusion, whereas for $0.5 < n < 1$ the anomalous transport, different from Fickian diffusion, is operating. The value of $n = 1$ is a special case in which the transport mechanism approaches the zero order, in the literature often referred to as case II transport, whereas for $n > 1$ it is frequently denoted as super case II transport [12].

Materials and methods

Calcium orthophosphate (V) (α TCP) – $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and hydroxyapatite (HAp) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ were used to obtain tablets of drug carriers. The starting powders were prepared by the wet method in the Department of Department of Ceramics and Refractory Materials of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH-University of Science and Technology in Krakow. The phase compositions of the powders were determined by X-ray diffractometry using a X'Pert Pro Philips diffractometer. Tablets (FIG. 1) containing 1 g of α TCP - HAp mixture (TABLE 1), 50 mg of PTX and 0.6 ml of 3% Na_2HPO_4 solution were fabricated using excentric press EK-0 Erweka at the compression strength of 35 kN. Active surface area of drug release from the tablets was equal to 4.55 cm^2 . Total porosity of the samples studied was in the range of 32-38%. The carriers thus obtained constituted a homogeneous system (the drug uniformly distributed in the whole volume of the tablet was released from the whole of their volume).

TABELA 1. / TABLE 1.

Symbol tabletki Pellet symbol	Skład Composition	Porowatość całkowita Total porosity [%]	Gęstość pozorną Apparent density [g/cm^3]
T 1	98% mas. α TCP + 2% mas. HAp 98 wt.% α TCP + 2 wt.% HAp	37.62	1.58
T 2	94% mas. α TCP + 6% mas. HAp 94 wt.% α TCP + 6 wt.% HAp	38.02	1.55
T 3	90% mas. α TCP + 10% mas. HAp 90 wt.% α TCP + 10 wt.% HAp	32.27	1.72

Pentoksifylina (PTX) – lek z grupy syntetycznych pochodnych metyloksantyn jest białym, krystalicznym, bezwonym proszkiem o charakterze słabej zasady i stosunkowo słabych właściwościach lipofilnych. PTX bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie i w etanolu, a w środowisku o pH 7.4 jest nieznacznie zjonizowana. Jednym z najnowszych zastosowań PTX jest stosowanie jej w chorobach kości takich jak osteoporoza oraz choroba Sudecka.

Badane tabletki α TCP–HAp zawierające PTX umieszczano w kolbach okrągłodennych zawierających po 50 ml cieplego medium, które stanowiły roztwory buforu fosforanowego o pH 5 i 7.4 i buforu węglanowego o pH 10. Eksperyment przeprowadzono w temperaturze 37°C w termostатовanej łaźni wodnej z wytrząsaniem przy częstotliwości ruchów 60/min. W określonych odstępach czasu z kolbek pobierano po 3 ml roztworu, po czym ich zawartość uzupełniano buforem do stałej objętości 50 ml zapewniając w ten sposób warunki *sink*. Dla każdego typu tabletki wykonano po trzy oznaczenia. Stężenie PTX w badanych próbkach oznaczano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr Helios β UV-VIS, Unicam) z detekcją UV przy analitycznej długości fali 275 nm z wykorzystaniem sporządzonych wcześniej krzywych wzorcowych. W zakresie stężeń 1-30 μ g/ml wykazano w każdym przypadku liniowe zależności absorbancji w funkcji stężenia leku ($R^2 > 0.99$). W obliczeniach stosowano programy Microsoft Excel oraz WinNonlin (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Wyniki i dyskusja

Kinetykę procesu uwalniania badanego leku z danego rodzaju tabletki α TCP–HAp oceniano na podstawie ilości uwolnionej PTX w czasie do określonego medium. Na RYS. 2 i 3 przedstawiono zależności ilości uwolnionej PTX (wyrażonej w procentach) w czasie.

Jak wynika z RYS. 2 przebieg krzywych ilości uwolnionej PTX w czasie do buforu fosforanowego o pH 7.4 dla wszystkich trzech typów tabletek (T1, T2, T3) był podobny. Funkcje osiągnęły plateau po ok. 170 h trwania eksperymentu, a po czasie 216 h ze wszystkich badanych nośników uwolniło się 100% leku. W przypadku uwalniania PTX z tabletki T1 do medium o różnym pH (RYS. 3) obserwowano wyraźne różnice w profilu uwalniania leku. Funkcje osiągnęły plateau po ok. 120, 170 oraz 190 h, odpowiednio dla pH 5, 7.4 i 10.

Na RYSUNKACH 4 i 5 przedstawiono szybkość uwalniania PTX z badanych materiałów w funkcji czasu. Analizując RYS. 4 można zauważyć, że najwolniej lek uwalniał się z tabletki T1 o najniższej procentowej zawartości HAp, a najszybciej z tabletki T3, przy czym początkowo (przez ok. 50 h) szybkość uwalniania PTX z tabletki T3 była zdecydowanie większa w porównaniu do pozostałych. Maksymalne szybkości uwalniania leku wynosiły: 0.45, 0.55 i 0.75 mg/h, odpowiednio dla tabletek T1, T2 i T3, a po upływie ok. 180 h trwania eksperymentu wartości szybkości uwalniania PTX ze wszystkich nośników ustaliły się na stałym poziomie wynoszącym ok. 0.30 mg/h. Na kinetykę procesu uwalniania również miało wpływ środowisko do którego następowało uwalnianie leku. Szybkość uwalniania PTX była największa dla pH 5 (maksymalna szybkość 0.71 mg/h), a najmniejsza dla pH 10 (maksymalna szybkość 0.34 mg/h) (RYS. 5).

Analizę stężeń uwolnionego leku z badanych tabletek do odpowiedniego medium przeprowadzono zgodnie z modelem Higuchiego. Wyniki przedstawiono na RYSUNKACH 6 i 7 oraz w TABELI 2. Przebieg otrzymanych krzywych miał charakter sigmoidalny, przy czym w określonych przedziałach czasu był prostoliniowy.

Pentoxifylline (PTX) – a drug belonging to a group of synthetic methyloxantine derivatives, is a white, crystalline odourless powder showing weak basic and relatively weak lipophilic properties. PTX dissolves very well in water and ethanol; in the medium of pH = 7.4 it is slightly ionized. Its application in the treatment of bone diseases, such as osteoporosis or Sudeck disease is one of the most recent uses of this drug.

α TCP–HAp tablets studied, containing PTX were placed in round-bottomed flasks filled with 50 ml of the liquid medium (solutions of phosphate buffer of pH 5 and 7.4 or carbonate buffer of pH 10). The experiment was conducted at the temperature of 37°C in the thermostated water bath shaken at the frequency of 60 strokes per minute. In the given time intervals, 3 ml aliquots were withdrawn from the solutions which were then filled with the buffer solution to maintain the constant volume of 50 ml. In this way, the *sink* conditions were ensured. For each tablet, three determinations were performed. PTX concentration in the studied samples was analysed by spectrophotometric method (Helios β UV-VIS spectrophotometer, Unicam) at the analytical wavelength of 275 nm using previously determined calibration curve. Dependence of the absorbance on the drug concentration in the concentration range of 1-30 μ g/ml was linear ($R^2 > 0.99$). In the calculations, Microsoft Excel and WinNonlin (Pharsight Corp., Mountain View, CA) software packages were used.

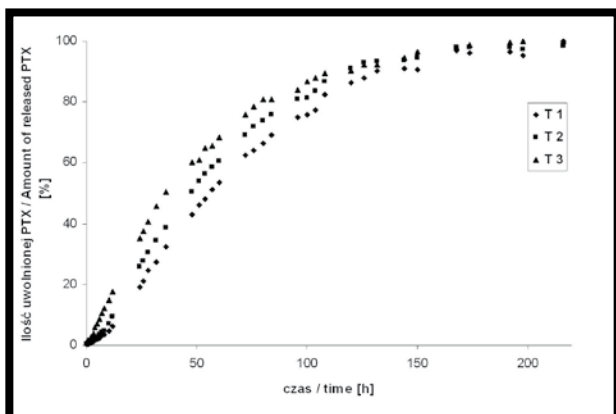
Results and discussion

Kinetics of the studied drug release process from a given type of the α TCP–HAp tablet was evaluated based on the amount of PTX released into a given medium as a function of time. In FIG. 2 and 3 dependences of the amounts of PTX released (in %) on time are shown.

As can be seen from the curves presented in FIG. 2, the amounts of PTX released into the buffer solution of pH=7.4 were similar for all three types of tablets (T1, T2, T3). Functions reached plateau after ca. 170 hours of the experiments and after 216 hours 100 % of the drug was released from all the carriers. In the case of PTX release from the T1 tablet into media of various pH (FIG. 3) distinct differences in the drug delivery profile were observed. Functions reached plateau after ca. 120, 170 and 190 hours for pH = 5, 7.4 and 10, respectively.

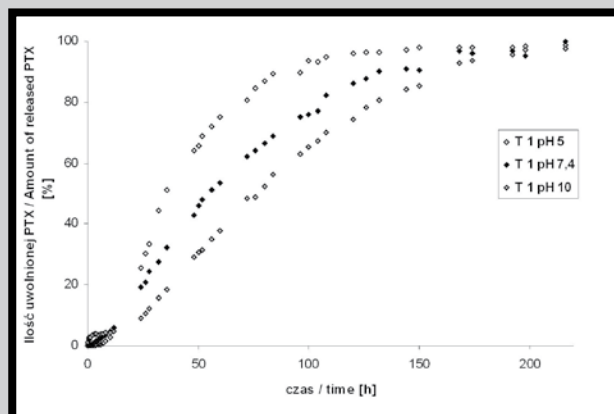
In FIGURES 4 and 5 the rate of PTX release from the materials studied is plotted as the function of time. When FIG. 4 is examined, it can be noticed that the slowest drug release was in the case of the T1 tablet, containing the smallest amount of HAp, and the fastest in the case of the T3 tablet. During the beginning of the experiment (for ca. 50 hours) the rate of PTX release from the T3 tablet was significantly higher than that observed for the other ones. Maximum rates of medicament release were the following: 0.45, 0.55 and 0.75 mg/h for the T1, T2 and T3 tablets, respectively. After ca. 180 hours of the experiments, values of PTX release from all the carriers stabilized at a constant level of ca. 0.30 mg/h. Kinetics of the process was also influenced by the medium into which the drug was released. The rate was the highest for pH = 5 (maximum rate of 0.71 mg/h), and the lowest for pH=10 (maximum rate of 0.34 mg/h) (FIG. 5).

Analysis of the concentrations of the drug released from the tablets into the investigated media was conducted using Higuchi model. Results are presented in FIGURES 6 and 7 as well as in TABLE 2. The curves showed sigmoid course, but within some time intervals linear functions were obtained.



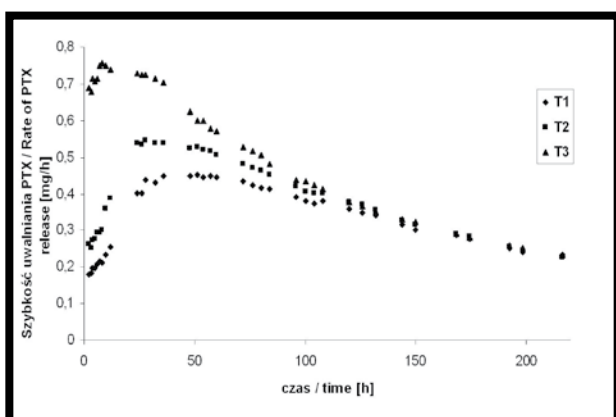
RYS. 2. Ilość uwolnionej PTX [%] w czasie z tabletek T1, T2, T3 do buforu o pH 7.4.

FIG. 2. Amount of released PTX [%] versus time from tablets T1, T2, T3 into the buffer solution of pH = 7.4.



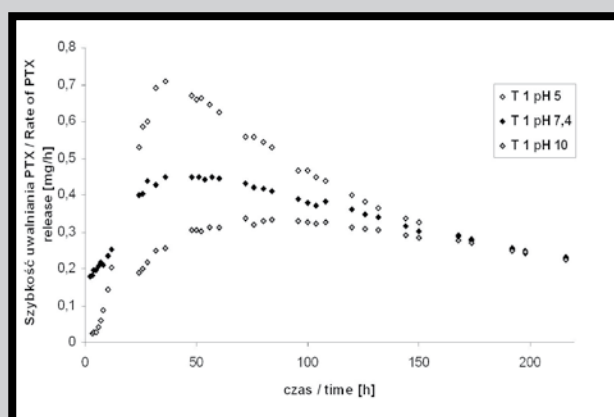
RYS. 3. Ilość uwolnionej PTX [%] w czasie z tabletki T1 do buforów o różnym pH (5, 7.4, 10).

FIG. 3. Amount of released PTX [%] versus time from the tablet T1 into the buffer solutions of various pH (5, 7.4, 10).



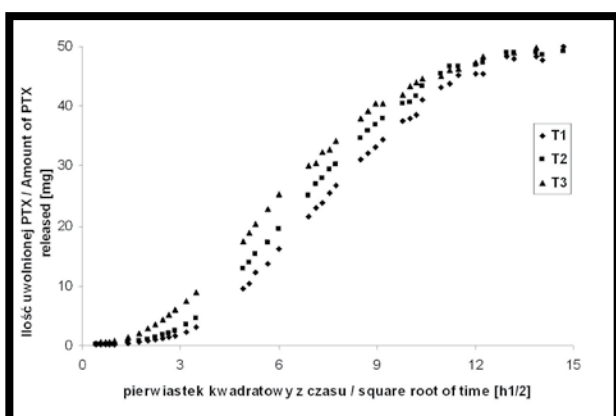
RYS. 4. Szybkość uwalniania PTX [mg/h] w czasie z tabletek T1, T2, T3 do buforu o pH 7.4.

FIG. 4. Rate of PTX release [mg/h] from T1, T2, T3 tablets into the buffer solution of pH = 7.4 as the function of time.



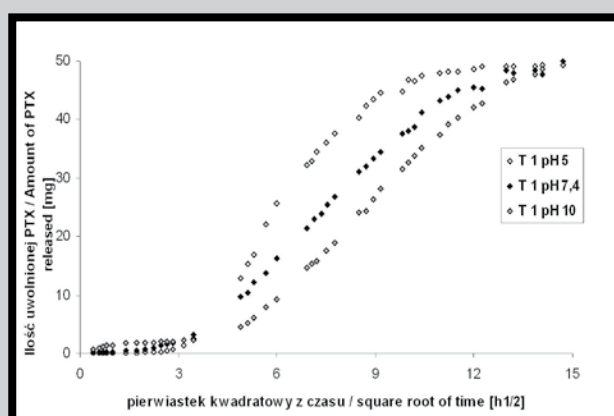
RYS. 5. Szybkość uwalniania PTX [mg/h] w czasie z tabletki T1 do buforów o różnym pH (5, 7.4, 10).

FIG. 5. Rate of PTX release [mg/h] from the T1 tablet into the buffer solution of various pH (5, 7.4, 10) as the function of time.



RYS. 6. Ilość uwolnionej PTX [mg] w funkcji pierwiastka kwadratowego z czasu z tabletek T1, T2, T3 do buforu o pH 7.4.

FIG. 6. Amount of PTX released [mg] from T1, T2, T3 tablets into the buffer solution of pH = 7.4 as the function of square root of time.



RYS. 7. Ilość uwolnionej PTX [mg] jako funkcja pierwiastka kwadratowego z czasu z tabletki T1 do buforów o różnym pH (5, 7.4, 10).

FIG. 7. Amount of PTX released [mg] from the T1 tablet into the buffer solution of various pH (5, 7.4, 10) as the function square root of time.

TABELA 2. Wartości stałej Higuchiego obliczone na podstawie równania (3)*.

TABLE 2. Values of Higuchi constant calculated based on equation (3)*.

Symbol tworzywa Symbol of the material	pH medium pH of the medium	Stała Higuchiego K_H Higuchi constant K_H [mg/h ^{1/2}]	R ² R ²
T1	5	8.6732	0.9864
T1	7.4	5.8390	0.9986
T1	10	5.6148	0.9980
T2	7.4	6.0003	0.9986
T3	7.4	6.2332	0.9926

* W obliczeniach stałej brano pod uwagę średnie dane uzyskane w przedziale czasu, w którym zależność pomiędzy ilością uwolnionego leku [mg], a pierwiastkiem kwadratowym z czasu była prostoliniowa.

* In the calculations, the mean values obtained for the time interval in which the dependence of the amount of drug released and the square root of time was linear were taken into account.

W TABELI 2 zebrano wartości stałej Higuchiego charakteryzującej szybkość uwalniania leku oraz współczynniki korelacji prostych będących zależnościami pomiędzy ilością uwolnionej PTX, a pierwiastkiem kwadratowym z czasu (równanie 3).

Jak wynika z powyższej tabeli, biorąc pod uwagę tabletki o różnym składzie uwalniające do medium o pH fizjologicznym wynoszącym 7.4, lek najszybciej uwalniał się z tabletki T3 (pomimo jej niższej w stosunku do pozostałych porowatości), natomiast najwolniej z tabletki T1. Dla tabletek o tym samym składzie (T1), a uwalniających PTX do środowiska o różnym pH, uwalnianie zachodziło najszybciej przy pH 5 (najwyższa stała Higuchiego równa 8,6732 [mg/h^{1/2}]), a najwolniej do medium o pH 10 (stała Higuchiego na poziomie 5,6148 [mg/h^{1/2}]).

Celem określenia mechanizmu uwalniania badanego leku, korzystając z otrzymanych zależności ilości uwolnionej PTX od czasu, obliczono dla wszystkich badanych nośników parametry równania Korsenmeyera i Peppasa (równanie 4). Wyniki zebrano w TABELI 3.

Otrzymane wartości wykładnika dyfuzyjnego (n) charakteryzującego mechanizm penetracji rozpuszczalnika i uwalniania leku wykazały, że uwalnianie PTX z tabletek α TCP-HAP miało charakter określany jako super zerowego rzędu (super case II transport, $n > 1$) z wyjątkiem uwalniania leku z tabletki T3 do medium o pH 7.4. W tym ostatnim przypadku uwalnianie zachodziło zgodnie z mechanizmem zerowego rzędu (case II transport, $n = 1$).

Wnioski

1. W badaniach *in vitro* stwierdzono stosunkowo powolne uwalnianie zawartej w materiałach α TCP-HAP substancji leczniczej. Różnice w procentowej zawartości obu komponentów, tzn. α TCP i hydroksyapatytu w tabletkach wpływały na szybkość uwalniania zawartego w nich leku.

2. O profilu uwalniania PTX, a co z tym idzie o szybkości uwalniania leku w czasie z biomateriałów ceramicznych, decydowało także pH środowiska. Analizując kinetykę uwalniania PTX z badanych biomateriałów stwierdzono, że szybkość uwalniania leku była tym większa im mniejsza była zawartość HAP w tabletkach i im niższe było pH środowiska.

TABELA 3. Wartości parametrów opisujących mechanizm uwalniania PTX zgodnie z równaniem (4) Korsenmeyera i Peppasa.

TABLE 3. Values of parameters describing the mechanism of PTX release in equation (4) proposed by Korsenmeyer and Peppas.

Symbol tworzywa Symbol of the material	pH medium pH of the medium	n (SE)	K (SE) [h ⁻ⁿ]	Mechanizm uwalniania Release mechanism
T1	5	1.519 (0.09340)	0.01840 (0.00039)	super zerowego rzędu super case II transport
T1	7.4	1.356 (0.02239)	0.00229 (0.00016)	super zerowego rzędu super case II transport
T1	10	1.273 (0.04160)	0.00199 (0.00031)	super zerowego rzędu super case II transport
T2	7.4	1.218 (0.02408)	0.00458 (0.00032)	super zerowego rzędu super case II transport
T3	7.4	0.967 (0.01401)	0.01549 (0.00057)	zerowego rzędu case II transport

In TABLE 2 values of Higuchi constant which characterizes the rate of the drug release as well as coefficients of the straight lines obtained for the dependences between the amounts of PTX released and the square root of time (equation 3) are collected.

As can be concluded from the data in TABLE 2 when the tablets of various compositions releasing the drug into the medium of physiological pH equal to 7.4 are compared, PTX release was the fastest from the T3 tablet (in spite of its lower porosity with respect to the other ones) and the slowest from the T1 tablet. In the case of the tablets of the same composition (T1), but releasing the drug into the solutions of various pH, the fastest PTX release was observed at pH = 5 (the highest Higuchi constant equal to 8,6732 [mg/h^{1/2}]), and the slowest at pH = 10 (Higuchi constant at the level of 5,6148 [mg/h^{1/2}]).

In order to determine the mechanism of the studied drug release, parameters of the Korsenmeyer and Peppas equation (equation 4) for all the investigated carriers were calculated based on the obtained dependences of the amounts of PTX released on time.

The obtained values of the diffusion exponent (n) which characterizes the mechanism of solvent penetration and drug release, showed that the PTX release from α TCP-HAP tablets followed the super case II transport ($n > 1$), with drug release from the T3 tablet into the medium of pH = 7.4 being the only exception. In this case, the release was in accordance with case II transport ($n = 1$).

Conclusions

1. *In vitro* experiments confirmed a relatively slow release of the therapeutic substance contained in the investigated α TCP-HAP tablets. Differences in the proportions of α TCP and HAP in the materials affected the rate of this process.

2. The release profile and, consequently, the rate of drug release from ceramic carriers were also influenced by the pH of the surrounding medium. When the kinetics of PTX release is analyzed, it should be noted that the rate of this process increases with the decrease in both, HAP content in the tablet and pH value of the medium.

3. Prawie w każdym przypadku uwalnianie leku zachodziło zgodnie z mechanizmem super zerowego rzędu (super case II transport).

4. Opracowanie nowej generacji wielofunkcyjnych bioceramicznych nośników leku, które z optymalną szybkością i na określonym poziomie terapeutycznym uwalniałyby dany lek, stwarza realną szansę uzyskania skuteczności i bezpieczeństwa leczenia różnych schorzeń kości.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Projekt nr R 15 003 03.

3. Almost in all the investigated cases, the drug was released according to the super zero order mechanism (super case II transport).

4. Development of new generation of multifunctional bioceramic drug carriers which would release the active substances at the optimum rate ensuring their therapeutic level, would make a chance to achieve efficient and safe treatment of various bone diseases.

Acknowledgement

This work has been supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education. Project No R 15 003 03.

Piśmiennictwo

- [1] Brazel Ch.S., Peppas N.A.: Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer*. 1999, 40, 3383-3398.
- [2] Castro C., Sánchez E., Delgado A., Soriano I., Núñez P., Baro M., Perera A., Evora C.: Ciprofloxacin implants for bone infection. In vitro-in vivo characterization. *J Control Release*. 2003, 93, 341-354.
- [3] Goto T., Kojima T., Iijima T.: Resorption of synthetic Poros hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *J Orth Sci*, 2001, 6, 444-447.
- [4] Hirabayashi H., Fujisaki J.: Bone-specific drug delivery systems. *Clin Pharmacokinet*. 2003, 42 (15), 1319-1330.
- [5] Itokazu M., Kumazawa S., Wada E., Wenyi Y.: Sustained release of adriamycin from implanted hydroxyapatite blocks for the treatment of experimental osteogenic sarcoma in mice. *Cancer Lett*. 1996, 107, 11-18.
- [6] Jain A.K., Panchagnula R.: Review skeletal drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2000, 206, 1-12.
- [7] Kim H., Fassihi R.: Application of a binary polymer system in drug release rate modulation. 1. Characterization of release mechanism. *J Pharm Sci*. 1997, 86 (3), 316-322.
- [8] Otsuka M., Nakahigashi Y., Matsuda Y., Fox J.L., Higuchi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 7. Effect of biological factors on indomethacin release from the cement loaded on bovine bone. *J Pharm Sci* 1994, 83 (11), 1569-1573.
- [9] Otsuka M., Matsuda Y., Fox J.L., Higuchi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 9: Effects of the mixing solution volume on anticancer drug release from homogenous drug-loaded cement. *J Pharm Sci*. 1995, 84 (6), 733-736.

References

- [10] Otsuka M., Matsuda Y., Kokubo T., Yoshihara S., Nakamura T., Yamamuro T.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting bioactive glass bone cement. III: the in vitro drug release from bone cement containing indomethacin and its physicochemical properties. *J Control Release*. 1994, 31, 111-119.
- [11] Otsuka M., Matsuda Y., Suwa Y., Fox J.L., Higuchi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 2. Physico-chemical properties and drug release rate of the cement-containing indomethacin. *J Pharm Sci*. 1994, 83 (5), 611-615.
- [12] Peppas N.A., Sahlin J.J.: A sample equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm*. 1989, 57, 169-172.
- [13] Raińska-Giezek T., Pawlik A.: Systemy nośnikowe do miejscowego dostarczania antybiotyków w zakażeniach kości. *Farmacja Polska*. 2002, 58 (5), 225-228.
- [14] Sánchez E., Baro M., Soriano I., Perera A., Evora C.: In vivo-in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants. *Eur J Pharm Biopharm*. 2001, 52, 151-158.
- [15] Shinto Y., Uchida A., Korkusuz F., Araki N., Ono K.: Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J Bone Joint Surg Am*. 1992; 74-B, 600-604.
- [16] Sivakumar M., Panduranga Rao K.: Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres. *Biomaterials*. 2002, 23, 3175-3181.

RUSZTOWANIA HYDROKSY- APATYTOWE DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH WYKONANE METODĄ "ROBOCASTING" – WSTĘPNE TESTY

K. GRYŃ¹, J. CHŁOPEK²

¹ WYDZIAŁ METALI NIEŻELAZNYCH,

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,

AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

² WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,

AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

* E-MAIL: KGRYN@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Artykuł prezentuje wyniki wstępnych badań przeprowadzonych na przestrzennych porowatych strukturach bioceramicznych - rusztowaniach hydroksyapatytowych - wykonanych metodą „Robocasting”. Badaniom poddano próbki o różnych wariantach geometrii strukturalnej przy zachowaniu tych samych wymiarów zewnętrznych. Własności wytrzymałościowe wyznaczono w próbie trójpunktowego zginania. Złożoną mikro i makro strukturę pokazano na zdjęciach wykonanych przy użyciu mikroskopu skaningowego i optycznego. Wykonano testy w środowisku SBF.

Analiza wyników pokazała, że pomimo niskich własności wytrzymałościowych drukowane struktury przestrzenne mogą służyć do zastosowań medycznych. Wystarczająca sztywność, odpowiednia porowatość, a także biogodność, pozwala na ich zastosowanie jako rusztowań dla komórek – skafoldów.

Słowa kluczowe: HAp, robocasting, rusztowania

[Inżynieria Biomateriałów, 76, (2008), 13-16]

Wprowadzenie

Oczekiwania rynku medycznego związane z zastosowaniem porowatych biomateriałów ceramicznych doprowadziły do poszukiwania nowych technologii produkcyjnych. Opracowano wiele technik umożliwiających wytwarzanie takich materiałów. Zalicza się do nich: spiekanie ziaren, spienianie chemiczne i mechaniczne, odwzorowanie porowatej matrycy, liofilizacja [1]. Jedną z nowatorskich metod, opatentowaną i udoskonalaną w ostatnich latach, pozwalającą kontrolować kształt, wielkość i makroporowatość jest drukowanie przestrzenne, występujące częściej pod nazwą „Robocasting” [2]. Podjęto próby jej adaptacji do zastosowań w przetwórstwie proszków ceramicznych [3], a w szczególności bioceramicznych [4,5]. Pierwsze badania miały na celu opracowanie technologii przygotowania materiału budulcowego, opartego na proszku ceramicznym i przeprowadzenia go do postaci pasty, ponieważ tylko w ten sposób możliwe jest użycie hydroksyapatytu jako budulca w omawianej metodzie. Przygotowano cały proces technologiczny (drukowanie, suszenie, spiekanie) do wyrobu przestrzennych struktur hydroksyapatytowych o kontrolowanej porowatości [5,6]. Jedną z wielu zalet tej technologii, warstwowego kształtowania przyrostowego, poza minimalnymi nakładami, praktycznie zerowym odpadem i szybkością produkcji jest możliwość dowolnego formowania wytwarzanego obiektu.

HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS BY "ROBOCASTING" FOR MEDICAL APPLICATIONS – PRELIMINARY TESTS

K. GRYŃ¹, J. CHŁOPEK²

¹ FACULTY OF NON-FERROUS METALS,

AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,

AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

² FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,

AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,

AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

* E-MAIL: KGRYN@AGH.EDU.PL

Abstract

Preliminary results on three-dimensional porous bioceramic structures - hydroxyapatite scaffolds - are presented in this article. "Robocasting" was used as a fabrication method. Sets of prepared samples had the same outer diameter but different structure of macroporosity. 3-pts bending test was applied to reveal mechanical properties. Optical microscope and scanning electron microscope (SEM) pictures were taken for structural analysis of printed and sintered samples. Biological activity was tested in simulated body fluid (SBF).

Analyses show that low mechanical properties of three-dimensional porous structures are not decisive and do not exclude such structures from medical applications. Sufficient stiffness, appropriate porosity and biocompatibility allow using them as scaffolds for bone cells growth.

Keywords: HAp, robocasting, scaffolds

[Engineering of Biomaterials, 76, (2008), 13-16]

Introduction

Global medical market puts a big pressure on new porous bioceramic materials discovering and elaborating along with new fabrication techniques. Many novel methods were elaborated e.g. powder sintering, chemical and mechanical foaming, liofilization, foam replication [1]. One of the most recent, discovered and patented a few years ago, being still developed is "Robocasting" known also as three-dimensional printing [2]. There were trials to adapt it for ceramic powders processing [3], especially for bioceramics [4,5]. Early research led to a feedstock material preparation – paste/ink, which is necessary for "Robocasting" process. Complete manufacturing chain (printing, drying, sintering) for 3D bioceramic structures with controlled porosity was elaborated [5,6]. One of many advantages of additive layer-by-layer forming among low production costs, short production time and almost none scraps is its aptitude for arbitrary object shaping. CAD-CAM environment is used to transfer and convert data (geometry, size and shape, macrostructure). This technology is almost perfect for cooperation with computer tomography (CT). In the near future it will be possible to use digitalized data for "personalized" implant design and fabrication especially for an individual patient.

Dane dotyczące geometrii, kształtu i struktury przetwarzane są w układzie CAD-CAM. Takie rozwiązanie idealnie nada się do współpracy np.: z tomografem komputerowym. Dzięki temu w niedalekiej przyszłości możliwe będzie przygotowanie kształtki do indywidualnego przypadku - pacjenta. Dlatego dąży się do uzupełnienia tej technologii produkcyjnej o pełną charakterystykę wytwarzanych obiektów i możliwe najszybszego wprowadzenia jej do użytku klinicznego.

Materialy

Celem pracy było wstępne przebadanie i opisanie własności fizycznych, mechanicznych i biologicznych porowatych rusztowań hydroksyapatytowych wykonanych metodą „Robocasting”. Materiałem budulcowym była pasta oparta na bazie proszku hydroksyapatytowego (Trans-Tech, Adamstown, MD). Średni wymiar cząstek proszku wynosił $2,3\mu\text{m}$, powierzchnia swobodna $3,57\text{m}^2/\text{g}$. Artykuł opisujący technologie wytwarzania próbek opublikowano w „Engineering of Biomaterials” [6].

Metodyka badań

Charakterystyka próbek

Przygotowano zestawy drukowanych próbek porowatych i drukowanych próbek litych o jednakowych wymiarach zewnętrznych ($25 \times 2,5 \times 5\text{mm}^3$). Do drukowania próbek porowatych użyto dyszy drukującej o średnicy wewnętrznej $410\mu\text{m}$. Warstwy zorientowano względem siebie pod kątem 90° . Różnice w strukturze osiągnięto poprzez zmiany odległości pomiędzy drukowanymi liniami, a dokładniej ich wzdlużnymi osiami symetrii. Odległość ta wynosiła odpowiednio: $1,6\text{mm}$ dla siatki rzadkiej (RYS. 1a) i $0,82\text{mm}$ dla siatki gęstej (RYS. 1b). Ponieważ wydrukowane próbki, bezpośrednio po wypalaniu, zostały użyte do testów (główne założenie prowadzonych badań – brak obróbki wykańczającej) już na etapie ich projektowania uwzględniono przyszły 12% skurcz termiczny w procesie spiekania ($3\text{h}/1200^\circ\text{C}$). Jego wielkość została empirycznie wyznaczona w poprzednich badaniach [4].

Gotowe próbki (po spiekaniu) poddano obserwacjom pod mikroskopem optycznym (Stereo Discovery V8, Zeiss) w celu dokonania pomiarów ich geometrii. Średnica pojedynczej linii wynosiła $\approx 350\mu\text{m}$. Dla pojedynczego makroporu zmierzono następujące wymiary: dla siatki rzadkiej - długość boku: $\approx 0,72\text{mm}$, przekątna: $\approx 1,0\text{mm}$, wysokość: (przyjęto średnią podwojoną grubość pojedynczej linii/warstwy) $\approx 0,7\text{mm}$; dla siatki gęstej - długość boku: $\approx 0,33\text{mm}$, przekątna: $\approx 0,47\text{mm}$, wysokość: $\approx 0,7\text{mm}$. Na tej podstawie obliczono przybliżoną objętość pojedynczego makroporu, która wyniosła odpowiednio: dla siatki rzadkiej $\approx 0,326\text{mm}^3$, dla siatki gęstej $\approx 0,076\text{mm}^3$.

W przypadku drukowanych próbek litych zastosowano dysze o średnicy wewnętrznej $1,37\text{mm}$, a odległość pomiędzy pojedynczymi liniami ustalono na $2,6\text{mm}$. Uzyskano w ten sposób spójną warstwę składającą się ze ściśle przylegających do siebie linii. Po ułożeniu pięciu kolejnych warstw w stos otrzymano drukowaną próbkę litą (RYS. 1c).

Materials and experimental techniques

The purpose of this preliminary research was to investigate and describe physical, mechanical and biological properties. As a feedstock material hydroxyapatite paste based on hydroxyapatite powder (Trans-Tech, Adamstown, MD) was applied. Grain size $2,3\mu\text{m}$, surface area $3,57\text{m}^2/\text{g}$. Samples preparation procedure was published in “Engineering of Biomaterials” [6].

There were two sets of porous and one set of bulk material samples prepared. In all cases outer diameters were the same ($25 \times 2,5 \times 5\text{mm}^3$). For porous samples printing $410\mu\text{m}$ nozzle was used. Layer to layer orientation - angle between layer's grids - was 90° . Difference in the macroporosity's structure was achieved by different distance between single rods. For the coarse grid $1,6\text{mm}$ (FIG. 1a), for the fine grid it was $0,82\text{mm}$ (FIG. 1b). After printing, drying and sintering samples were directly used for mechanical testing. That is why at the designing stage future 12% thermal shrinkage (when sintered $3\text{h}/1200^\circ\text{C}$) was taken under consideration. Its quantity was experimentally determined in previous research [4].

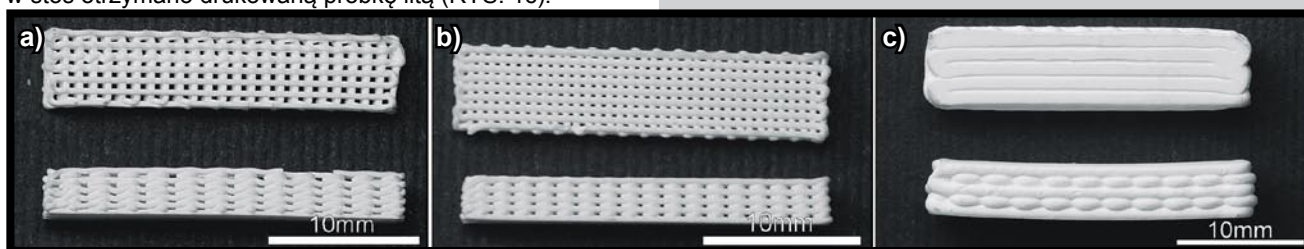
Sintered samples were observed and their geometry was measured under optical stereo-microscope (Stereo Discovery V8, Zeiss). Single macropore diameters were as follow: for the coarse grid - side length $\approx 0,72\text{mm}$, diagonal $\approx 1,0\text{mm}$, height $\approx 0,7\text{mm}$; for the fine grid - side length $\approx 0,33\text{mm}$, diagonal $\approx 0,47\text{mm}$, height $\approx 0,7\text{mm}$. Volume of single macropore was calculated on the basis of this data. For the coarse grid it was $0,362\text{mm}^3$ and for the fine grid it was $0,076\text{mm}^3$.

Bulk material samples were printed with $1,37\text{mm}$ inner diameter nozzle and spacing $2,6\text{mm}$ was applied. A coherent layer was achieved. Five layers were printed one on the top of the other. As a result bulk material sample was printed (FIG. 1c).

Mechanical properties

For mechanical properties testing rectangular bars with three different types of macrostructures were printed and taken under investigation: the coarse grid, the fine grid and the bulk material. European norm (PN-EN 843-1 and PN-EN 843-2) determined their size and shape. The aim of the testing was to measure the strength and Young modulus. Up to five samples were tested to obtain average values. Universal testing machine “Zwick 1435” was used to evaluate the 3-pts bend strengths (σ) and Young modulus (E). Crosshead speed of $2\text{mm}/\text{min}$ and the span 20mm was applied. Results are inserted in TABLE 1.

Comparing to the natural bone ($E=3\div 25\text{GPa}$, $\sigma=50\div 150\text{MPa}$) printed samples have rather low values of σ and E, hence they can not be used as stabilizers or anastomosis plates. Analyses show that low mechanical properties are not decisive and do not exclude such structures from medical applications. Sufficient stiffness, appropriate porosity and biocompatibility allow using them as scaffolds for bone cells growth.



RYS. 1. Wydrukowane i spieczone próbki użyte do badań: a) siatka rzadka, b) siatka gęsta, c) lita.

FIG. 1. Printed and sintered samples used in research: a) dense grid, b) coarse grid, c) bulk material.

Własności mechaniczne

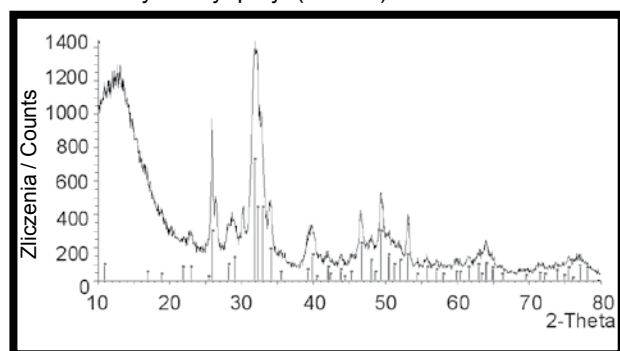
Do badań własności mechanicznych użyto próbek o geometrii wynikającej z wymogów stawianych w normach dotyczących trójpunktowego zginania (PN-EN 843-1 i PN-EN 843-2) [7,8], poddanych wykańczającej obróbce termicznej. Badania przeprowadzono na maszynie wytrzymałościowej „Zwick 1435”. Odległość między podporami wynosiła 20mm. Prędkość przesuwu trawersy ustalono na 2mm/min. Na podstawie testów mechanicznych wyznaczono wytrzymałość na zginanie (σ) i moduł Younga (E). Otrzymane wyniki zestawiono w TABELI 1.

W porównaniu z własnościami mechanicznymi naturalnej kości ($E=3\div 25\text{GPa}$, $\sigma=50\div 150\text{MPa}$) badane próbki cechują się stosunkowo niskimi wartościami E i σ . Z tego powodu hydroksyapatytowe struktury przestrzenne wykonane metodą „Robocasting” nie mogą pełnić funkcji stabilizatorów, płytek zespalających czy też bezpośrednio samodzielnie zastępować kości. Mimo to, wystarczająca sztywność kształtek pozwala na zastosowanie ich jako rusztowań komórkowych, na których tkanka kostna będzie mogła narastać przyjmując tym samym ich kształt.

Badania strukturalne

Próbki poddano obserwacji pod mikroskopem optycznym stereoskopowym (Stereo Discovery V8, Zeiss) i skaningowym (Hitachi S-4300SE/N, FEI Nova Nano SEM). Analiza zdjęć jednoznacznie pokazała doskonałą homogeniczność struktury również w miejscach połączenia warstw (RYS. 2). Nie stwierdzono pęknięć lub innych defektów. Przypuszcza się, że uwidoczniona mikrostruktura (RYS. 3) może mieć korzystny wpływ na adhezję i proliferację komórek, a także mieć znaczenie w przypadku jej nasączenia (np.: nośnik leku), gdzie liczy się kontrolowane uwalnianie danego składnika(ów). W celu potwierdzenia stawianej tezy planowane są dalsze badania ukierunkowane na odpowiedź komórkową.

Przeprowadzono testy na dyfraktometrze rentgenowskim (Siemens D500). Ich celem było sprawdzenie składu chemicznego wytworzonych próbek. Pozytywne wyniki potwierdziły pełną zgodność z założeniami. Otrzymany materiał to hydroksyapatyt (RYS. 4).



RYS. 4. Dyfraktogram rentgenowski badanych rusztowań.

FIG. 4. X-Ray diffraction diagram.

Badania biologiczne

Do badań biologicznych wykorzystano takie same próbki, jakich użyto do testów mechanicznych. Przygotowany zestaw próbek poddano badaniom aktywności biologicznej w SBF. Zestaw 7 próbek inkubowano przez 14 dni w temp. $37\pm 1^\circ\text{C}$ przy jednoczesnym monitorowaniu pH środowiska. Po 8 dniach inkubacji na powierzchni próbek zaobserwowano pojawienie się kalafiorowatych struktur apatytowych (RYS. 5b), a dodatkowo po 14 dniach narosły kryształki chlorkowe (RYS. 5c). W trakcie trwania testu pH środowiska ulegało niewielkim wahaniom w przedziale $6,6\div 7,4$.

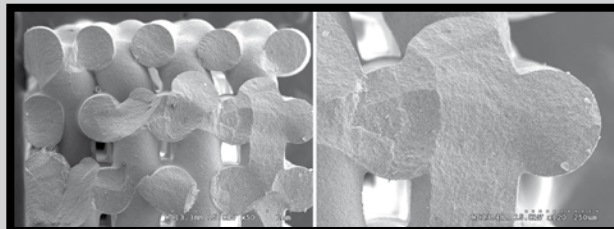
TABELA 1. Własności wytrzymałościowe uzyskane w próbie trójpunktowego zginania.

TABLE 1. Mechanical properties – 3pts bending test.

	Drukowana siatka rzadka Printed coarse grid	Drukowana siatka gęsta Printed fine grid	Drukowana lita Printed bulk material
Fmax [N]	16,75	23,90	84,51
σ [MPa]	5,41	9,76	20,43
E [GPa] moduł Younga Young modulus	1,85	2,8	2,83

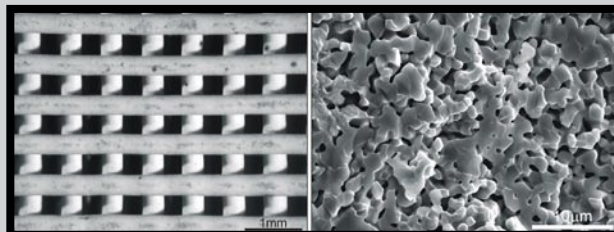
Structural observations

Samples were observed under optical stereomicroscope (Stereo Discovery V8, Zeiss) and scanning electron microscope (Hitachi S-4300SE/N, FEI Nova Nano SEM). Not only macro- but also microporosity was revealed. Analyses of microphotographs indicate that printed samples have homogenous microstructure including layer-to-layer contact areas (FIG. 2). No defects, bonding or other imperfection in the macrostructure were found. It is supposed that such microstructure (FIG. 3) might be advantageous because of cells adhesion and proliferation. Also it might be useful for drug delivery systems.



RYS. 2. Jednorodność struktury w miejscu połączenia warstw.

FIG. 2. Homogenous structure revealed in layer-to-layer contact areas.



RYS. 3. Uwidoczniona struktura: a) makroporowatość (x24), b) mikroporowatość (x3000).

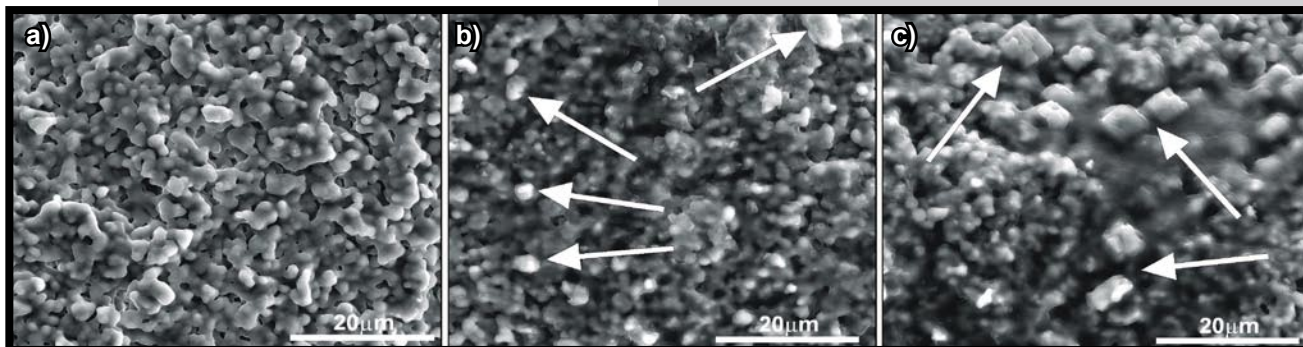
FIG. 3. Scaffold's structure. a) macroporosity (x24), b) microporosity (x3000).

X-Ray diffraction

X-ray diffraction profile of printed samples was recorded (Siemens D500). Diagram shows that material obtained is in fact HAp and no transitions occurred during fabricating process (FIG. 4).

In vitro evaluation

For biological activity testing an acellular simulated body fluid (SBF) was used. Set of 7 samples was incubated for 14 days at $37\pm 1^\circ\text{C}$. In the same time pH was monitored. After 8 days of incubation some small cauliflower-like apatite structures appeared on the samples' surface (FIG. 5b). In addition, after 14 days little cubical chloride crystals grew (FIG. 5c). During incubation small fluctuation of pH in range $6,8-7,4$ was observed.



RYS. 5. Wyniki testów w SBF: a) próbka odniesienia (0 dni), b) po 8 dniach inkubacji (strzałkami pokazano narośnięte struktury apatytowe), c) po 14 dniach inkubacji (strzałkami pokazano kryształy chlorkowe). Powiększenie x5000.

FIG. 5. Samples incubated in SBF: a) reference, b) after 8 days (arrows show apatite structures formed on the samples' surface), c) after 14 days (arrows show chloride crystals). Magnification x5000.

Wnioski

Na podstawie analizy uzyskanych wyników stwierdzono, że metoda „Robocasting” nadaje się do wytwarzania przestrzennych rusztowań hydroksyapatytowych o kontrolowanej porowatości. Stosując tą metodę, a także wykorzystując dane dotyczące własności mechanicznych poszczególnych wariantów geometrii strukturalnej, możliwe jest zaprojektowanie i wykonanie kształtki, która będzie indywidualnie dopasowana do pełnionego przez implant zadania np.: o kształcie dostosowanym do przebiegu linii największych/najmniejszych naprężeń, ze wzmocnionym rdzeniem czy odpowiednio dobranym gradientem makroporowatości. Analiza rentgenowska jednoznacznie potwierdziła zakładany skład chemiczny. Wynika z tego, że w trakcie procesu technologicznego nie dochodzi do niepożądanych przemian. Dlatego, z punktu widzenia biogodności, wytwarzane rusztowania mogą być bez obaw poddane dalszym testom biologicznym i klinicznym.

Rusztowania wykonane opisaną metodą doskonale wpisują się w obszar tematyczny związany z wypełnieniami ubytków kostnych np.: pourazowych czy też związanych z resekcją części tkanek kostnych wykazujących nieodwracalne zmiany nowotworowe. Stanowią bardzo dobrą alternatywę do autoprzeszczepów dotychczas stosowanych w tego typu przypadkach.

Udzielenie jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej zastosowania wytwarzanych rusztowań jako materiału implantacyjnego wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Będą one nastawione na testy *in vitro* (toksyczność, odpowiedź komórkowa), a także *in vivo* (odpowiedź organizmu, zarastanie i przerastanie, gojenie). Dzięki temu uzyskana zostanie pełna charakterystyka przygotowanego materiału.

Conclusions

All tests and analysis have proven that “Robocasting” method is suitable for three-dimensional hydroxyapatite structures with controlled macroporosity fabrication. Shape and size of the scaffold may be individually fitted. Data obtained from 3-pt bending test might be used for designing and manufacturing scaffolds assigned for particular tasks or specific function e.g. maximum load/stress direction, with reinforced core or with graded macroporosity. XRD test showed that chemical content does not change during processing and no transitions appeared.

There are many hard tissue diseases like trabecular (cancellus) bone, osteoporosis, osteoarthritis or traumatic defects. In this field “Robocasting” method has a lot to offer. Specially designed and printed scaffolds are alternatives to allografts and autografts commonly used in such cases.

To find out if the assumptions are right more research should be done. They will be focused on *in vitro* (toxicity and cell response) and *in vivo* tests (body reaction, real proliferation and adhesion, healing). Hence, full description of such material will be prepared.

Acknowledgement

We thank A.P.Tomsia and E.Saiz of Lawrence Berkeley National Laboratory, California for the support and facilities available in their laboratory, especially Robocasting printer.

This work was supported by research project: 0408/R/2/T02/06/01.

Piśmiennictwo

- [1] Z. Jaegermann, A. Ślósarczyk: “Gęsta i porowata bioceramika korundowa w zastosowaniach medycznych”; AGH – Uczelniane wydawnictwa naukowo-dydaktyczne, Kraków 2007.
- [2] J. Cesarano, P. Clavert: „Freeforming objects with low binder slurry”; US Patent #6027326, 2000.
- [3] J.A. Levis: “Direct-write assembly of ceramics from colloidal inks”; Solid State & Materials Science 6 (2002) 245-250.
- [4] E. Saiz, L. Gremillard, G. Menendez, P. Miranda, K. Gryń, A.P. Tomsia: “Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds”; Materials Science and Engineering: C, Vol. 27, Issue 3, April 2007, 546-550.
- [5] P. Miranda, E. Saiz, K. Gryń, A.P. Tomsia: „Sintering and robocasting of β -tricalcium phosphate scaffolds for orthopedic applications”; Acta Biomaterialia, Vol. 2, Issue 4, July 2006, 457-466.

References

- [6] K. Gryń, J. Chłopek, E. Saiz, A.P. Tomsia: „Sposób wytwarzania materiałów o kontrolowanej porowatości z hydroksyapatytu przy wykorzystaniu metody Robocasting”; Engineering of Biomaterials, No. 62, Vol.X, June 2007, 26-29.
- [7] Norma europejska PN-EN 658-3: „Techniczna ceramika zaawansowana – Mechaniczne własności kompozytów ceramicznych w temperaturze pokojowej – Część 3: Oznaczenie wytrzymałości na zginanie”; sierpień 2002.
- [8] Norma europejska PN-EN 843-1: „Techniczna ceramika zaawansowana – Własności mechaniczne ceramiki monolitycznej w temperaturze pokojowej – Część 1: Oznaczenie wytrzymałości na zginanie”; grudzień 2006.

STUDY ON MECHANICAL ASPECTS OF THE STRUCTURAL MODIFICATION OF ϵ -POLYCAPROLACTONE WITH THE WOLLASTONITE NANOPARTICLES

J. PODPORSKA, E. SOŁTYSIAK, M. BŁĄŻEWICZ*

DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AGH - UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
KRAKÓW, POLAND

* E-MAIL: MBLAZEWC@UCI.AGH.EDU.PL

Abstract

Following the request for novel composite biomaterials for bone tissue engineering, nanocomposites consisted of ϵ -polycaprolactone and wollastonite, were prepared. Primary mechanical properties were examined and it was shown that the presence of wollastonite nano-particles affects significantly the Young's modulus, tensile strength, fracture stress and work-of-fracture of the polymer matrix.

Keywords: polymer nanocomposites, nanowollastonite, bone implants, composite processing, mechanical properties, bioactivity

[*Engineering of Biomaterials*, 76, (2008), 17-19]

Introduction

Since the discovery of nano-composite structure of the bone, the design of materials for hard tissue regeneration focuses on this specific group of materials [1-4]. Nanocomposites based on resorbable polymers and bioceramics shows superior mechanical and bioactive properties in comparison to conventional materials (metals, ceramics and polymers). Such materials are characterized by bioactive features that leads to forming apatite layer on their surface and therefore to form chemical bond between implant and host tissue. They can also improve protein adsorption and adhesion of osteoblasts to the implant surface [5,6].

Up till now polymer nano-composites containing hydroxyapatite (collagen/HAp, PLA/collagen/HAp, alginates/collagen/HAp, chitosan/HAp, gelatine/HAp, PCL/HAp, PLA/HAp), bioglasses and β -tricalcium phosphate are subject of interest of many researchers. Wollastonite is another bioactive and biocompatible material, which due to its good mechanical properties and excellent bioactive features may be an interesting alternative to hydroxyapatite and bioglasses [7-17].

In this study our aim was to obtain a biodegradable polymer (PCL)/ceramic (wollastonite) nanocomposite and to investigate its mechanical and surface properties determined in view of possible medical applications as bone implant materials.

Materials and Methods

Commercially available poly- ϵ -caprolactone delivered by Sigma-Aldrich ($M_n=80.000$) was used for preparation of composites. Granules of the polymer were dissolved in dichloromethane (POCH) in concentration of 10wt. %.

Wollastonite powders were obtained by the controlled pyrolysis of organosilicone precursors (Lukosil 901, Lucebni Zavody, Kolin, Czech Republic) with active fillers ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, SiO_2) as previously described, and milled to nano-grain size in attrition mill [18-20]. To define the average grain size and the grain size distribution of milled powders, Nanosizer-ZS (Malvern Inc.) was used.

It is assumed that the formation of apatite layer on biomaterials surface is precondition of their osteoinductivity. Wollastonite has the ability to restructure its morphology and to induce nucleation of apatite when immersed in simulated body fluid (SBF), whose ion concentration is similar to those in human body plasma (27 mM HCO_3^- , 2.5 mM Ca^{2+} , 1.0 mM HPO_4^{2-} , 142 mM Na^+ , 125 mM Cl^- , 5 mM K^+ , 1.5 mM Mg^{2+} , and 0.5 mM SO_4^{2-}). In this study the aqueous solution of SBF was obtained according to Kokubo and collaborators experiment and buffered at pH 7.25 [21]. From wollastonite ceramics bars were formed, sintered at 1200°C and soaked for 7 days at 37°C in SBF solution. After the test, surface of the samples was examined by the Scanning Electron Microscope (SEM), Jeol Nano SEM with the EDS analysis.

In the next step, polymer nanocomposites with different content of ceramic powders (0.5wt. %, 1wt. %, 2wt. %, 4wt. % and 6wt. %), were prepared by the solvent evaporation method. One sample without wollastonite was prepared as the reference material. Wollastonite nano-powder was suspended in dichloromethane and as received suspension was mixed with the solution of polycaprolactone. In order to obtain high dispersion of nanoparticles in the polymer and to avoid agglomeration effect, the solution was homogenized with use of ultrasonic homogenizer. Produced mixtures were poured onto Petri dishes to form thin foils. Solvent was removed during two-step process: 24 hours drying in air, and 48 hours in a vacuum drier.

Mechanical properties of nanocomposites were examined by the universal testing machine ZWICK 1435. Samples with dimensions 0.5 x 7 cm were subjected to uniaxial tensile stress. Five specimens of each type were tested and the results were expressed as mean values and standard deviation (SD). The Young's modulus, tensile strength, fracture stress and work-of-fracture of obtained nanocomposites have been investigated.

Results and discussion

Wollastonite ceramic

FIG. 1 presents histogram of grain size distribution. Obtained wollastonite-containing powders are well defined, grain size is distributed in nanometric scale and the mean grain size oscillates around 100nm.

FIG. 2 and 3 shows the SEM micrographs of wollastonite-containing ceramics surface before and after immersion in SBF fluid for 7 days. Sintered ceramics shows very good bioactivity. The entire surface was well covered by the crystalline layer, with morphology characteristic for calcium apatite. Additionally, chemical point analysis (EDS), confirmed presence of phosphorus and calcium. Ca/P ratio can indicate the presence of hydroxyapatite.

Results showed that wollastonite ceramics obtained according to the previously described method leads to material characterised by very good bioactivity. It can be easily processed to the nanometric form. That makes it useful in preparation of biodegradable polymer-based nanocomposites. During the biodegradation process of such materials, polymer matrix dissolves and simultaneously becomes a source of bioactive nano-wollastonite. The presence of such particles leads to formation of new bone by formation of hydroxyapatite layer on their surface which enhances bone tissue regeneration.

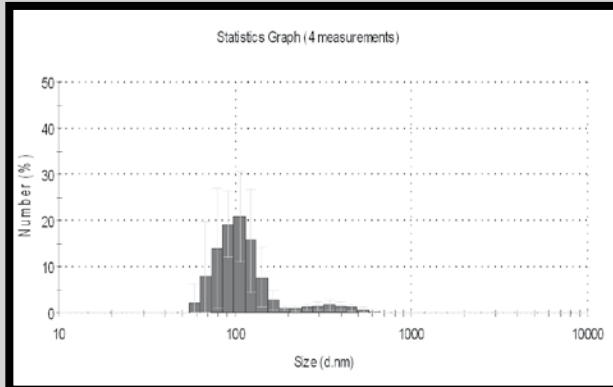


FIG. 1. The grain size distribution of wollastonite powder.

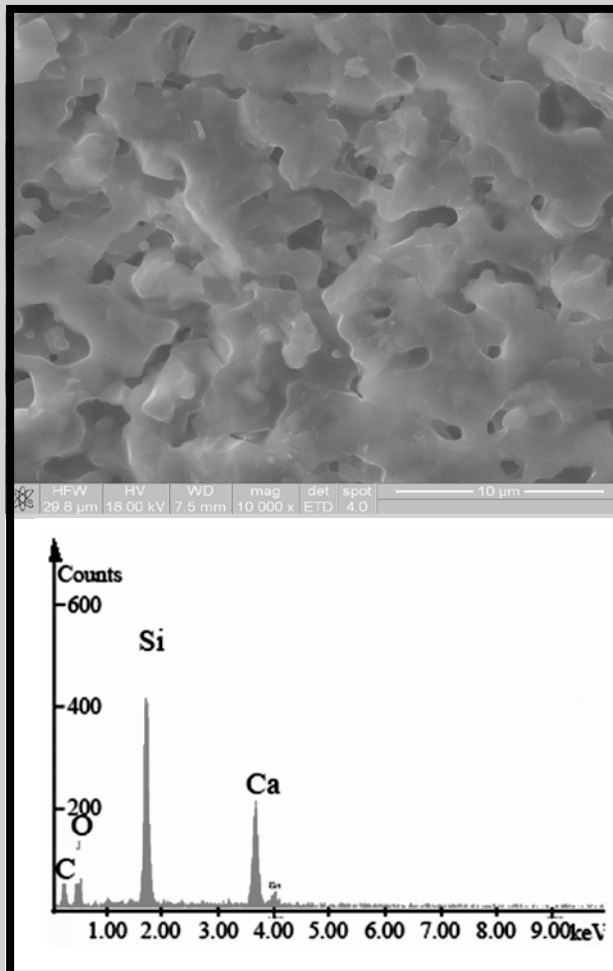


FIG. 2. SEM micrograph and EDS analysis of sintered wollastonite containing ceramics (1200°C) before immersion in SBF.

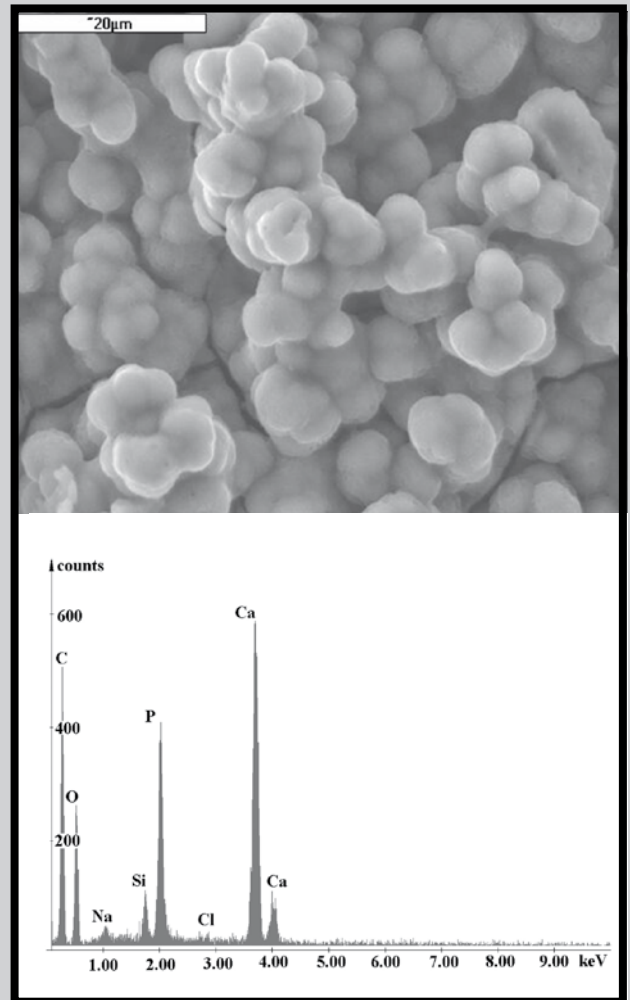


FIG. 3. SEM micrograph and EDS analysis of sintered wollastonite containing ceramics (1200°C) after 7 days of immersion in SBF.

Nanocomposite;

PCL/wollastonite ceramic – mechanical properties

The results of mechanical properties examination are summarized in TABLE 1.

Evaluation of mechanical properties of the obtained nanocomposites shows, that small addition of wollastonite significantly affects these properties by increasing Young's modulus, tensile strength, maximum strain-to-fracture and work-of-fracture. The highest values of all investigated parameters were observed at the lowest content of wollastonite nanopowder: 0,5 and 1wt.%. With increasing amount of the nanoparticles, all mechanical characteristics systematically decreased. Such behaviour indicates that with lower content of wollastonite powder particles are well dispersed in the polymer and form chemical bonds with the matrix. This fact has decisive effect on increasing of the mechanical properties. However, the amount of active sites in polymer structure is limited, therefore the content of reinforcing filler larger than 1 wt.% degrades the composite properties, since it occupy all possible active sites. After formation of all possible chemical bonds, remaining ceramics nanoparticles tend to aggregate and such aggregates act as microstructure defects which significantly reduce the mechanical properties of the composite.

Conclusions

Intensive nucleation of calcium phosphates on the surfaces of obtained wollastonite ceramics indicates very good bioactive properties of this material.

Bioactive wollastonite ceramic processed to form of nanometric powder modifies polycaprolactone matrix at the molecular level, affecting its mechanical properties. The best properties were obtained with modifier content in the range between 0.5 and 1 wt.%. After further investigations, PCL/nanowollastonite composite may be the suitable candidate in manufacturing of 3D porous scaffolds for regenerative medicine and bone tissue engineering application.

Acknowledgements

This work was supported by The Ministry of Science and Higher Education, grant No. 3T08D02030.

TABLE 1. The results of composite mechanical properties testing. Rm – fracture stress, ϵ Fmax – tensile strength, E- Young's modulus, W-work-of-fracture.

Sample	Rm [MPa]	ϵ Fmax [%]	E [MPa]	W [Nmm]
PCL (pure)	11.0 ± 2.9	233.3 ± 92.0	245.2 ± 24.7	1097.3 ± 104.3
PCL+6% wollastonite	14.8 ± 1.5	232.7 ± 21.1	369.8 ± 36.7	831.3 ± 67.7
PCL+4% wollastonite	11.8 ± 2.5	195.5 ± 58.1	306.8 ± 32.1	834.0 ± 98.9
PCL+2% wollastonite	14.5 ± 1.9	286.9 ± 27.2	347.9 ± 28.5	1230.7 ± 102.6
PCL+1% wollastonite	20.0 ± 3.6	471.5 ± 26.4	350.8 ± 11.6	1948.0 ± 104.1
PCL+0,5% wollastonite	21.0 ± 3.5	520.5 ± 29.1	340.3 ± 10.1	2768.7 ± 137.6

References

- [1] G. Wei, P. X. Ma; *Biomat.*, Vol 25 (19) 2004, 4749-4757.
- [2] J. Yan, J.J. Mecholsky Jr., K. B. Clifton; *Bone*, Vol. 40(2) 2007, 479-484.
- [3] Haiyan Li, and Jiang Chang; *Comp Sc and Tech*, 65(14) 2226-2232.
- [4] Chouzouri, M. Xanthos; *A. Biomat.*, 2007, Vol. 3(5), 745-756 G.
- [5] W.J.E.M. Habraken, J.G.C. Wolke, J.A. Jansen; *Adv. Drug Del. Rev.*, Vol. 59 (4-5) 2007, 234-248.
- [6] A. Liu, Z.Hong, X. Zhuang, X. Chen, Y. Cui, Y. Liu, X. Jing; *A. Biomat. Vol 4 (4)* 2008, 1005-1015.
- [7] S. Kim, M. Park, O.Jeon, C.Choi. B. Kim; *Biomat.Vol. 27 (8)* 2006, 1399-1409.
- [8] M. Kikuchi, Y. Suetsugu, J. Tanaka and M. Akao; *J Mater Sci Mater Med* 8 (1997), 361-364.
- [9] D. Choi, K.G. Marra and P.N. Kumta; *Mater Res Bull* 39 (2004), 417-432.
- [10] X. Zhang, Y. Li, Y. Zuo, G. Lv, Y. Mu, H. Li; *Comp.Vol. 38 (3)*, 2007, 843-848.
- [11] L. Jiang, Y. Li, X. Wang, L. Zhang, J.Wen, M. Gong; *Carbo.e Pol.*, Vol. 74 (3,4) 2008, 680-684.
- [12] S. Liao, F. Watari, Y. Zhu, M. Uo, T.Akasaka, W.Wang, G. Xu, F. Cui; *Dent.I Mat.*, Vol. 23 (9) 2007, 1120-1128.
- [13] A.R. Boccaccini, V. Maquet; *Compos Sci Technol* 63 (2003), 2417-2429.
- [14] S. Verrier, J.J. Blaker, V. Maquet, L.L. Hench and A.R. Boccaccini; *Biomat.* 25 (2004), 3013-3021.
- [15] M. Wang, L.L. Hench, W. Bonfield; *J Biomed Mater Res* 42 (1998), 577-586.
- [16] J. Tong, Y. Ma, R.D. Arnell, Lu. Ren; *App. Sc. and Man.*, Vol. 37(1) 2006, 38-45.
- [17] L Zhao, J Chang; *J. of Mat. Sc.: Mat. in Med.* 15 (2004), 625-629.
- [18] T. Gumula, C. Paluszkiwicz, M. Blazewicz; *J. Mol. Structure* 704 (2004) 259.
- [19] T. Gumula, J. Podporska, M. Blazewicz; *Eng. Biomat.* 47-53 (2005) 85.
- [20] J. Podporska, M. Błażewicz, B. Trybalska, Ł. Zych; *Proces. and App. of Cer.*, Vol 2 [21]. A. Oyane, H.-M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki and T. Nakamura, ; *J. Biomed. Mater. Res.*, 65A, 188-195 (2003).

HYBRID CARBON LAYERS FOR MEDICAL APPLICATION

DOROTA NOWAK^{1*}, PIOTR NIEDZIELSKI²

¹ TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING
1/15 STEFANOWSKIEGO ST., 90-924 LODZ, POLAND

² TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING
1/15 STEFANOWSKIEGO ST., 90-924 LODZ, POLAND

* E-MAIL: DKARGULEWICZ@O2.PL

Abstract

Carbon layers thanks to their advantages (high biocompatibility, good wear resistance, high corrosion resistance) found the application in medicine. The authors of presented work have obtained improvement of above-mentioned properties (high hardness) with use of hybrid RF PACVD method. Carburizing of the AISI 316L stainless steel is connected with risk of decrease of corrosion resistance which is caused by $Cr_{23}C_6$ formation on the grain boundaries. In the presented work corrosion parameters of the modified elements was investigated. The substrate material used in this work was AISI 316L stainless steel. The hybrid process was performed by RF PACVD method and consisted in carburizing of the sample at the beginning and afterwards carbon film synthesis. The corrosion resistance investigation was conducted using saline solution at similar to human body temperature (37°C), the duration of the investigation was two weeks. Corrosion investigation of modified elements proved that suitable choice of carburizing parameters during the hybrid process doesn't cause lowering of corrosion resistance of AISI 316L steel. Moreover microscope observations of the modified materials' structures didn't show any track of carbide disengagements on the grain boundaries.

Keywords: hybrid carbon layer, corrosion resistance of stainless steel, RF PACVD methods

[Engineering of Biomaterials, 76, (2008), 20-23]

Introduction

Carbon coatings, allowing on airtight covering of modified element surface, improve the properties (high hardness, good corrosion and wear resistance, good adhesion, effective thermal conductivity and high biocompatibility) of treated elements and have found applications in orthopaedics, cardiovascular components, guidewires, etc [1]. However, as the carbon coatings are very thin, when they are coated on soft material like austenitic stainless steel, they can flake off. That is caused by plastic deformation under high load [2,3]. The only way to avoid this kind of damage is the substratum hardening, what is possible due to the carburizing of the material. However, carburizing of the element made of the austenitic stainless steel is connected with reduction of its corrosion resistance caused by long influence of temperature above 550°C (above this temperature the chromium carbides ($Cr_{23}C_6$) are formed on the grain boundaries) [4]. In recent years the low-temperature carburizing is very popular for stainless steel, because of the only 470°C process temperature.

Cao et al. proved that during the carburizing process carried out in low temperature there are only Hägg carbides - Fe_3C_2 in the material [5-7].

Ueda et al. described duplex treatment of AISI 304 austenitic stainless steel, but it was carried out with use of two separated equipment: for the DC power source apparatus carburizing process, whereas manufacturing of DLC coating was realized with use of RF plasma CVD method [3]. Authors of presented work carburized and then coated the AISI 316L stainless steel in one two stages process inside the RF PACVD reactor chamber. The corrosion investigation proved that good assorted parameters of hybrid process do not cause reduction of corrosion resistance.

Materials and methods

As a substrate material the AISI 316L stainless steel was used. The stainless steel bars of 20mm diameter were cut into 6mm pieces. The faces of the discs were ground.

The hybrid was made during one process consists of two stages, inside the RF PACVD reactor chamber with use of different reactive mixtures depending on the process stage. First stage consisted in manufacturing of the diffusive layer and it was carried out in the flow of two gas mixtures: $Ar+H_2+CH_4$ or $Ar+CH_4$, in the second stage the adhesive carbon layer was deposited using the CH_4 . The parameters of the process are presented in TABLE 1.

TABLE 1. Parameters of hybrid process.

	RF Carburizing process		Carbon layer manufacturing	
	etching	process	etching	process
Time [min]	30	150 - 300	10	3
Gas mixture	$Ar+H_2$, -	$Ar+CH_4$, $Ar+H_2+CH_4$	-	CH_4
Potential [V]	800	600 - 1000	1000	800

The corrosion resistance investigation was conducted using device showed on FIGURE 1. Investigated sample was dipped in saline solution at similar to human body temperature (37°C). The constant temperature was kept with thermostat. The duration of the investigation was one or two weeks, depending on the corrosion growth.

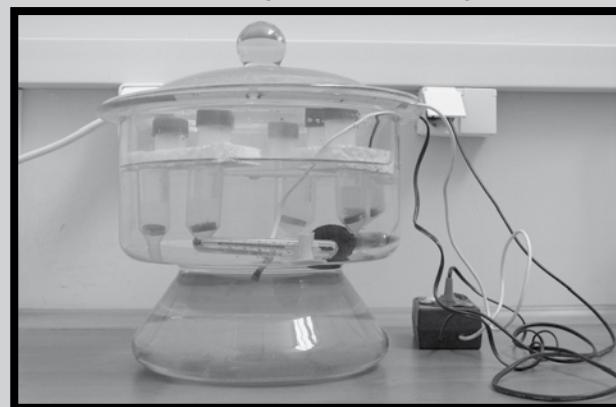


FIG. 1. Device use to corrosion resistance investigation at similar to human body temperature.

The microstructures of treated layers were observed with a scanning electron microscopy (SEM) after etching with use of a solution composed of 10 ml of nitric acid, 20 ml of hydrofluoric acid and 30 ml of glycerine. A sample surface after the corrosion test was investigated using the optical microscopy.

Results and Discussions

Influence of the process parameters on the materials structure

Diffusive layer in the material

On FIG. 2 are showed the cross sectionals micrographs of the modified AISI 316L stainless steel samples after etching. On some of the photos (a,b,c) man can obtain tracks of the grains fragmentation in the material. These are the thickest (45 μm) and the best visible on the picture 2b because the sample was etched by 30 minutes at 1000V and then carburized by 5 hour at 1000V. Picture 2a shows the grains fragmentation reach the depth of 6 μm .

Good visible carburized layer show pictures 2e and 2f. The thickness of this layers amounts 3 μm and 2,5 μm accordingly. Sample 5 was heated by 30 minutes and then carburized with use of $\text{Ar}+\text{H}_2+\text{CH}_4$ mixture by 5 hours, sample 6 was not heated and was carburized with use of $\text{Ar}+\text{CH}_4$ by 5 hour. The carburized layer is not visible in sample 4, which was etched by 30 minutes in $\text{Ar}+\text{H}_2$ mixture and then carburized by 5 hour in $\text{Ar}+\text{H}_2+\text{CH}_4$.

Adhesive carbon films on the material surface

Picture 2a shows 2 μm thick adhesive film on the sample surface, but in some places the layer tears off the surface. On the pictures 2a and 2c the carbon layer is very thin. The adhesive films of above – mentioned samples were manufactured the same day as the carburizing process. The authors think that it is the reason of the grains fragmentation in the material.

There is a thick layer on the sample surface on d (2 μm) and e (3 μm) picture, but this layer isn't strongly coherent. The 0,5 μm thin layer but good coherent is showed on picture f. The adhesive layer, of the sample number 4,5 and 6 samples was produced the next day after slow cooling of the sample inside the reactor chamber. The authors think that it is the reason why the grains fragmentation inside the material in this case is not visible.

FIG. 2. Cross section of the treated sample:
a) sample no 1; b) sample no 2; c) sample no 3;
d) sample no 4; e) sample no 5; f) sample no 6.

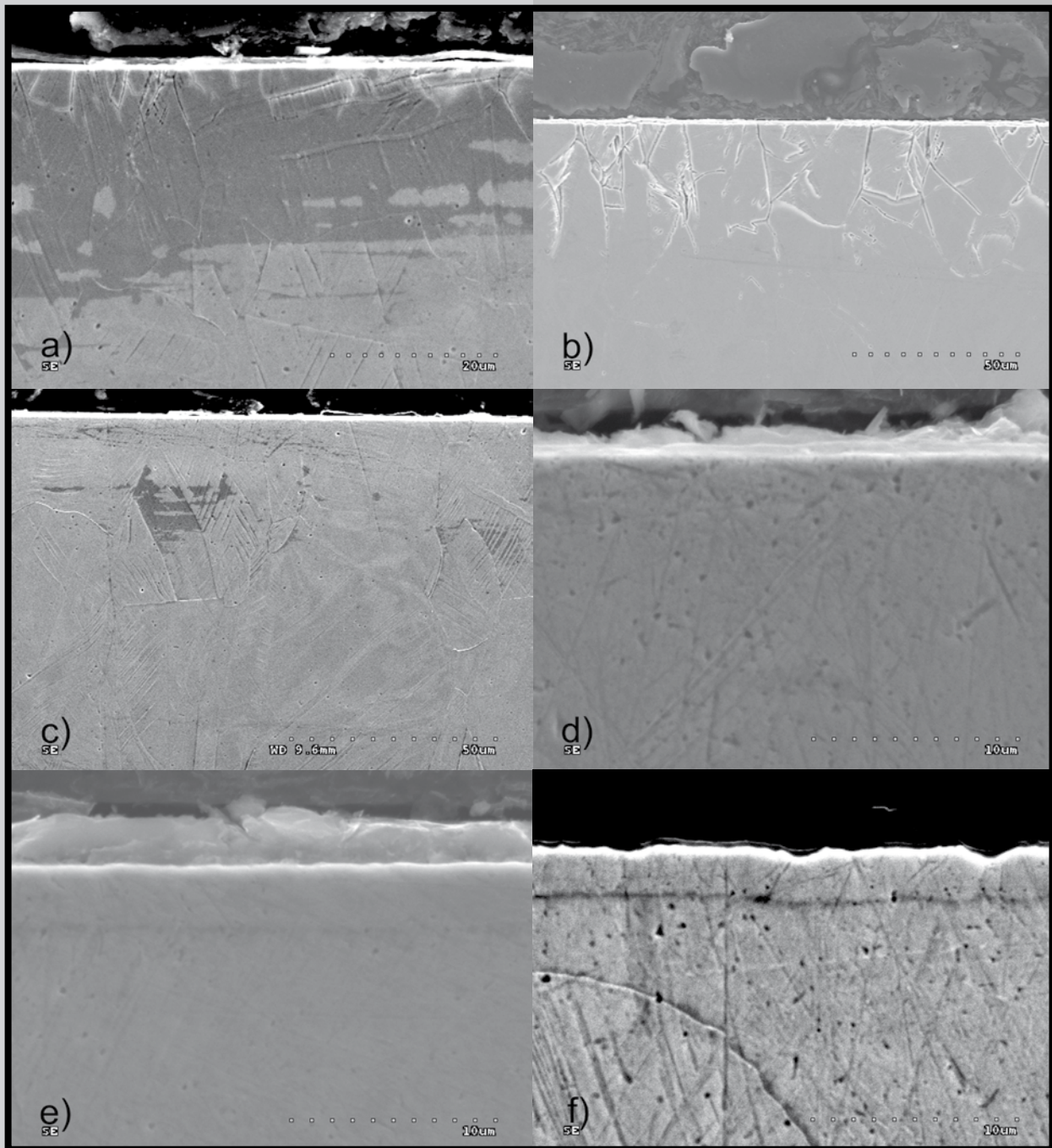


TABLE 2. Saline immersion test result.

No	Immersion time			
	1h	24h	One week	Two weeks
1	Slightly yellow liquid	Insignificant amount of corrosion products in test-tube	Numerous small pits – investigation was stopped	-
2	Intensive yellow liquid colour	A lots of corrosion products in test-tube	Pits on the whole sample's surface – investigation was stopped	-
3	Liquid colour without alteration	Slightly yellow liquid, very little of corrosion products	A little of small pits on the sample surface – investigation was stopped	-
4	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration, layer separations were visible
5	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration
6	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration	Liquid colour without alteration

Influence of the process parameters on the corrosion properties

Observation of liquid colour

An observation of the liquid's colours and surface facies of the samples during the one or two weeks-long corrosion test was carried out. The duration of the test was depended on the corrosion progress, if there was an intensively yellow liquid and a lot of corrosion products in the test – tube, the test was stopped. The results of the observation are presented in TABLE 2. In case of sample 2 there was well visible change of liquid's colour after one hour incubation in the saline solution and after one day there were a lot of corrosion products in the test - tube. The investigation was discontinued after one week and on the sample surface were observed good visible pits. The examination was stopped after one week also in case of the samples 1 and 3, for the sake of changes in liquid colours and a few pits on the surface. Without colour changes of was saline solution being in contact with the samples 4, 5 and 6 after two weeks of incubation. After this time there were visible layer separations on the 4th sample surface.

The microscopic observation confirmed the macroscopic observation. There were well visible pits on the surface of samples number 1, 2 and 3 after one week long corrosion test (FIG. 3.). In case of sample 2 the whole surface was covered by rust - coloured pits. Samples 1 and 3 had less of pits but these were also good visible. The authors think that the high bias voltage and long time of the hybrid process causes the grains fragmentation in the material. Furthermore, it is considered that the high bias voltage causes the material's overheating and contributes to the chromium carbides formation on the grains boundaries, what is responsible for the reduction of corrosion resistance.

The microscopic observation of the samples 4, 5 and 6 didn't show any pits on the surface (FIG. 4.). It is thought that the reason of the better corrosion resistance of these samples is the fact that the carbon layer was manufactured next day after slow cooling of the sample inside reactor chamber. The visible layer separation was visible only in case of sample 4 and 5. On the surface of sample number 6 no were observed. The authors think that the essential influence on the layer separation has the surface preparation.

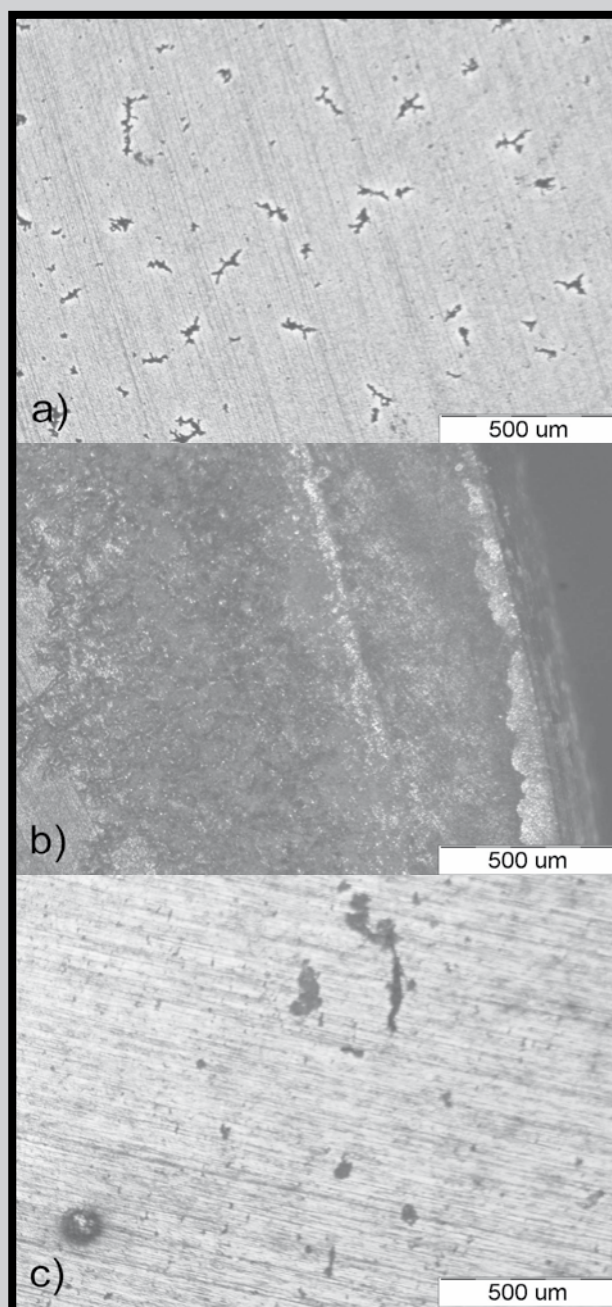


FIG. 3. Microphotographs of AISI 316L stainless steel surface treated in hybrid RF PACVD process after one week long corrosion test: a) sample no 1; b) sample no 2; c) sample no 3.

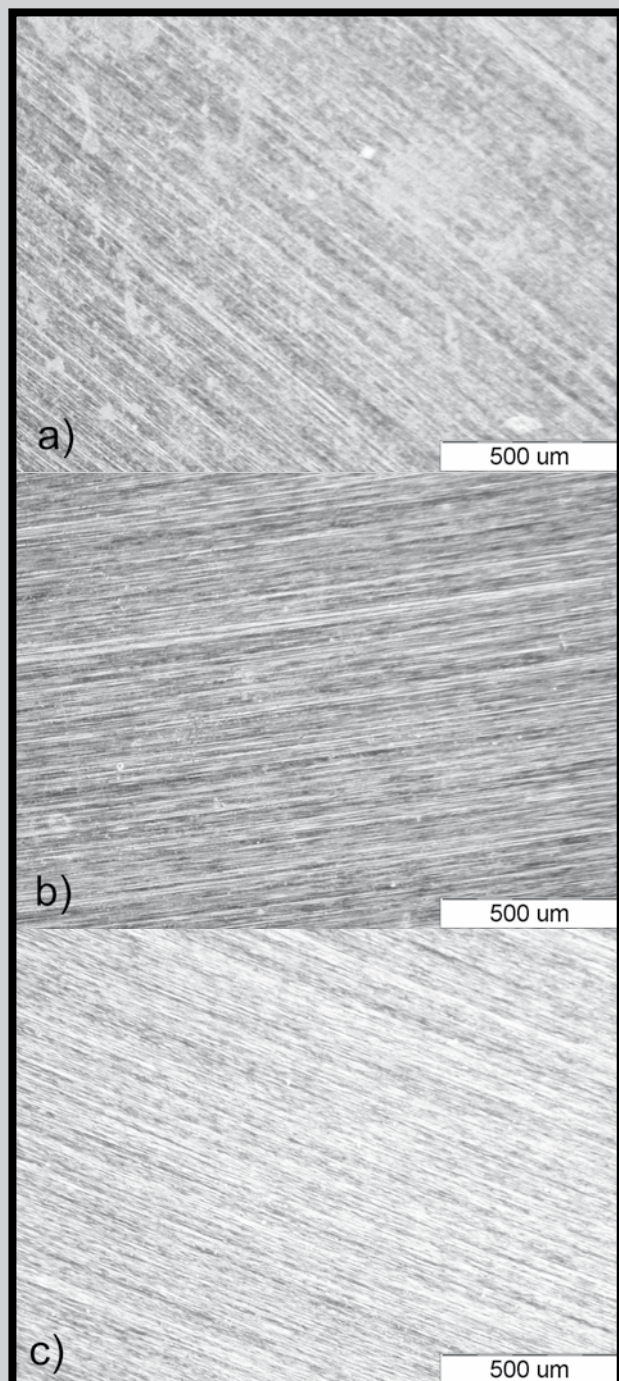


FIG. 4. Microphotographs of AISI 316L stainless steel surface treated in hybrid RF PACVD process after two weeks long corrosion test: a) sample no 4; b) sample no 5; c) sample no 6.

Conclusions

Conventional carburizing process of elements, which are made of austenitic stainless steel, can induce their damage. This endamage is created by lowering of the corrosion resistance. The authors proved that it is possible to manufacture the hybrid layer with use of RF PACVD method on the AISI 316L stainless steel without reduction of their corrosion resistance. The SEM investigation demonstrates, that the hybrid process allows to manufacture the carburized layer of 2,5 to 3 μm thickness, whereas the carbon layer on the surface was in range of 0,5 to 3 μm thick. Corrosion investigations performed with use of saline solution proved that elements, modified in hybrid process with well – chosen parameters, didn't lose their corrosion resistance.

Acknowledgments

This work was financed by the Polish State Committee in 2007-2009 for Scientific Research No N N507 4469 33.

References

- [1] Geoffrey Dearnaley, James H. Arps: "Biomedical applications of diamond-like carbon (DLC) coatings: A review", *Surface and Coatings Technology*, No. 200, 2005, pp 2518-2524.
- [2] Jun Qu, Peter J. Blau, Brian C. Jolly: "Tribological properties of stainless steels treated by colossal carbon supersaturation", *Wears*, No. 263, 2007, pp 719-726.
- [3] N. Ueda, N. Yamauchi, T. Sone, A. Okamoto, M. Tsujikawa: "DLC coating on plasma – carburized austenitic stainless steel", *Surface and Coatings Technology*, No. 201, 2007, pp 5487-5492.
- [4] Bong-Seok Suh, Won-Jong Lee: "Surface hardening of AISI 316L stainless steel using plasma carburizing", *Thin Solid Films*, No. 295, 997, pp 185-192.
- [5] Y. Cao, F. Erns, G.M. Michal: "Colossal carbon supersaturation in austenitic stainless steels carburized at low temperature", *Acta Materialia*, No. 51, 2003, pp 4171-4181.
- [6] F. Ernst, Y. Cao, G.M. Michal: "Carbides in low-temperature-carburized stainless steel", *Acta Materialia*, No. 52, 2004, pp 1469-1477.
- [7] G.M. Michal, F. Ernst, H. Kahn, Y. Cao, F. Oba, N. Agarwal, A.H. Heuer: "Carbon supersaturation due to paraequilibrium carburization: Stainless steels with greatly improved mechanical properties", *Acta Materialia*, No. 54, 2006, pp 1597-1606.

CHARAKTERYZACJA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH WARSTW WĘGLOWYCH NA UHDPE

DAMIAN BATORY, JACEK GRABARCZYK*, WITOLD KACZOROWSKI

INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ
* E-MAIL: JACKGRAB@P.LODZ.PL

Streszczenie

Polietylen dużej gęstości (UHDPE - Ultra High Density Polyethylene) jest jednym z najpopularniejszych polimerów stosowanych w medycynie. Z materiałem tym bardzo często możemy się spotkać w konstrukcjach stawów biodrowych czy kolanowych, gdzie nie bez znaczenia są ich odpowiednie właściwości mechaniczne. W zastosowaniach, gdzie wymagany jest niski współczynnik tarcia i wysoka odporność na zużycie, warstwy węglowe wydają się być najlepszym rozwiązaniem. Dodatkowo oprócz pozytywnego wpływu warstw węglowych na właściwości mechaniczne, powłoki te wpływają na poprawę biouzgodności pokrywanych materiałów. Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka mechanicznych właściwości warstw węglowych wytworzonych na podłożu UHDPE z użyciem różnych metod CVD i PVD. Najistotniejszym zagadnieniem było zbadanie zależności pomiędzy współczynnikiem tarcia i odpornością na zużycie a zastosowaną metodą i parametrami wytwarzania warstw. Badania trybologiczne zostały wykonane metodą pin-on-disc. Uzyskane wyniki wskazują na możliwości wykorzystania warstw węglowych na podłożu polimeru UHDPE jako powłok poprawiających odporność na zużycie oraz zmniejszających współczynnik tarcia.

Słowa kluczowe: UHDPE, warstwy węglowe, MW, RF, MS

[Inżynieria Biomateriałów, 76, (2008), 24-27]

Wprowadzenie

Przed współczesnymi implantami stawiane są coraz wyższe wymagania odnośnie ich biouzgodności, odporności korozyjnej, a także odporności na zużycie mechaniczne. Ostatnia z wymienionych właściwości nabiera szczególnego znaczenia przy implantach, które współpracują ze sobą lub tkankami w specyficznych węzłach tarcia. Takie implanty możemy spotkać w konstrukcjach endoprotez stawów biodrowych czy kolanowych. Narażone na przyspieszone zużycie implanty mogą nie tylko wymuszać konieczność przyspieszonej reimplantacji, ale także wywoływać reakcje alergiczne na toksyczne produkty ze zużywającej się powierzchni implantu. Chcąc jak najlepiej zabezpieczyć implant poszukuje się odpowiednich modyfikacji jego powierzchni. Jeden z takich sposobów został zaprezentowany w tym artykule. W celu osiągnięcia założonych celów autorzy tej pracy posłużyli się trzema plazmowymi technikami modyfikacji powierzchni biomateriałów, które łączyła możliwość uzyskiwania warstw na bazie węgla. Jak podaje literatura właśnie ten rodzaj warstw, a szczególnie warstwy NCD (nanocrystalline diamond), są w stanie zapewnić wysoką odporność na zużycie łącznie z dobrą biouzgodnością i odpornością korozyjną [1-4].

MECHANICAL CHARACTERIZATION OF CARBON-BASED LAYERS ONTO UHDPE

DAMIAN BATORY, JACEK GRABARCZYK*, WITOLD KACZOROWSKI

INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCE AND ENGINEERING,
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
1/15 STEFANOWSKIEGO ST. 90-924 ŁÓDŹ
* E-MAIL: JACKGRAB@P.LODZ.PL

Abstract

Ultra High Density Polyethylene (UHDPE) is one of the most popular polymer materials widely used in medicine. Very often UHDPE is utilised in hip joint and knee constructions, where its perfect mechanical properties are very important. Carbon-based layers seem to be very attractive material for many applications where low friction coefficient and high wear resistant are needed. Beside of positive mechanical properties these layers improve biocompatibility of covered surfaces. The aim of the study was the characterization of mechanical properties of different types of carbon-based layers manufactured with use of CVD and PVD methods on UHDPE. Precisely the purpose was to find the correlation between obtained friction and wear parameters and applied method and the deposition parameters. The friction coefficient and wear resistance were measured by the pin-on-disc method. As a result of the investigations it was noticed that hard carbon layers deposited on Ultra High Density Polyethylene's surface noticeably improve its wear resistance and ensure very low friction coefficient.

Keywords: UHDPE, carbon coating, MW, RF, MS

[Engineering of Biomaterials, 76, (2008), 24-27]

Introduction

Modern implant materials have to be up to higher and higher demands concerning their biocompatibility, corrosion parameters and resistance against mechanical wear. The last one is especially important in the case of implants, which parts cooperate with other in specific friction couples. Such implants can be found in hip and knee prosthesis constructions. Implants exposed to intensified wear can cause not only the necessity of earlier re-implantation but also the allergic reactions induced by the toxic products from worn out implant's surface. For the best protection of the implant still a new surface modifications are being worked out. One of these is presented in this paper. To realize the established purpose authors of his work used three plasmo-chemical modification methods. All of them let for synthesis of carbon based layers on the surface. As it is reported in world's literature this kind of layers, especially the NCD (nanocrystalline diamond) can assure good protection against wear together with good biocompatibility and corrosion resistance [1-4]. Experiments concerning plasma modifications of polymers widely discussed in the literature prove very high usability of these techniques, especially in the case of biomaterials [5,6]. With use of these technologies it is possible to create the most important surface properties of polymer materials and make wider the previous area of their application [7-9].

Opisane w literaturze prace nad plazmowymi modyfikacjami powierzchni tworzyw sztucznych dowodzą bardzo dużej przydatności tych technik, szczególnie w przypadku biomateriałów [5,6]. Za pomocą tych metod można kreować najważniejsze właściwości powierzchniowe polimerów zwiększając ich dotychczasowe obszary zastosowania [7-9].

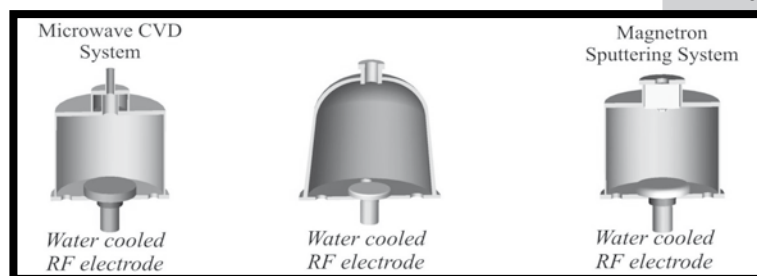
Materiały i metody

Do przeprowadzenia badań wykorzystane zostały podłoża z polietylenu dużej gęstości (UHDPE - Ultra High Density Polyethylene) ukształtowane w postaci walców o wymiarach umożliwiających przeprowadzenie testów pin-on disc z zastosowaniem trybotestera T-08 (RYS. 1). Powierzchnie czołowe próbek szlifowano, czyszczono metanolem w łaźni ultradźwiękowej oraz suszono przed każdym plazmowym procesem modyfikacji powierzchni.

Wykorzystano trzy oddzielne systemy będące na wyposażeniu Instytutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej (RYS. 2), czyli:

- system MW/RF PACVD
- system RF PACVD
- system RF PACVD/MS

Każda z wykorzystanych metod umożliwia wytwarzanie warstw na bazie węgla opierając się na rozkładzie metanu w plazmie wysokiej częstotliwości przy ciśnieniu od 20-200 Pa.



RYS. 2. Schematy systemów wykorzystanych w badaniach.

FIG. 2. Schematics of the deposition system used in presented work.

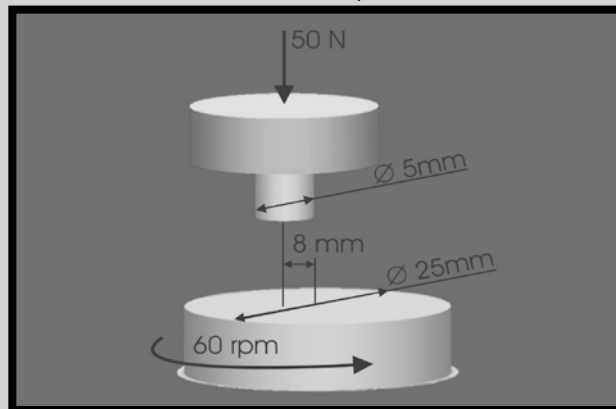
Parametry przeprowadzanych procesów plazmo-chemicznych zostały zoptymalizowane w celu uzyskania jednorodnej warstwy na powierzchni trzpienia wykonanego z UHDPE. W przypadku systemów MW/RF i RF modyfikacja powierzchni zastosowanego polimeru zachodziła dwuetapowo: wytwarzanie warstw węglowych poprzedzały procesy trawienia (usieciowienia) powierzchni. Natomiast przy modyfikacji powierzchni z wykorzystaniem systemu RF/MS po trawieniu ale przed wytwarzaniem warstw węglowych przeprowadzano proces rozpylania magnetronowego tytanu, zapewniający powstanie adhezyjnej struktury od międzywarstwy Ti do gradientowej powłoki tytanu i węgla.

Do badań trybologicznych wykorzystany został trybo tester T-08. Warunki testów i wymiary próbek zaprezentowano na RYS. 1. Przedstawione parametry zostały wytypowane w celu, w miarę możliwości urządzenia, odzwierciedlenia warunków panujących w stawie biodrowym podczas normalnego chodzenia dorosłego człowieka. Obciążenie 50 N gwarantowało naciski około 2,5 N na każdy milimetr kwadratowy trzpienia, a ustalona prędkość liniowa 5 cm/s odpowiadała prędkości ślizgania się główki stawu biodrowego po panewce [10].

Przeprowadzone badania przebiegały w warunkach tarcia suchego bez jakichkolwiek płynów, co odbiega od warunków naturalnych, ale testy te miały za zadanie zintensyfikować zachodzące procesy zużycia.

Materials and methods

The investigations were performed with the use of UHDPE (Ultra High Density Polyethylene) samples prepared in the cylinder shape with dimensions which made it possible to carry out the pin-on-disc tests with use of T-08 tribotester (FIG. 1). Frontal surfaces of the samples were grinded, cleaned with methanol in the ultrasonic cleaner and dried out before the each modification process.



RYS. 1. Realizowany węzeł tarcia trzpień – dysk.

FIG. 1. Realized friction couple in pin-on-disc method.

For the investigations three different modification systems were used. All of them are available in the Institute of Materials Science and Engineering at Technical University Lodz (FIG. 2):

- MW/RF PACVD
- RF PACVD
- RF PACVD/MS

Each of three used methods let to manufacture carbon-based layers which consist in decomposition of methane in radio frequency plasma under pressure of 20-200 Pa. Parameters of performed plasmo-chemical processes were optimized to obtain the uniform layer on the UHDPE pins' surface. In the case of MW/RF and RF systems the surface modification was conducted through two stages: deposition processes were preceded by etching in Ar plasma. During the modification with use of RF PACVD/MS system after the etching process but before the carbon layer deposition thin, adhesion improving gradient Ti – C interlayer was deposited with the use of reactive magnetron sputtering process.

For the tribological investigations a T-08 tribotester was used. The test conditions and samples dimensions are presented in FIG. 1. Applied test parameters were matched to the conditions in femoral joint during normal walking of adult human [10]. Load of 50 N guaranteed loads about 2.5 N on each square millimeter of the pin, and the sliding speed 5 cm/s was equal to the sliding speed between the femoral head and the cup.

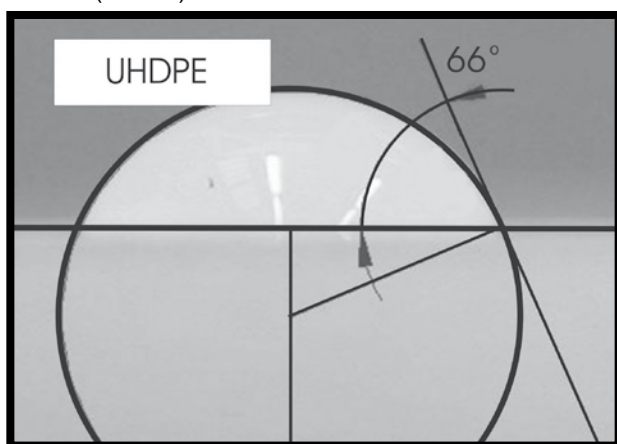
Presented investigations were performed under dry friction conditions without any lubricants, to intensify the wear processes occurred for the friction couple.

Results and Discussions

All of applied modification systems let to obtain the uniform coatings on whole samples' surface. In FIG. 3 view of the UHDPE samples, covered and uncovered with carbon-based layer are presented. In plasma techniques deposition of layers onto complicate shaped substrates is difficult. However in this case the adequately worked out process parameters let this phase of the investigations to be succeeded.

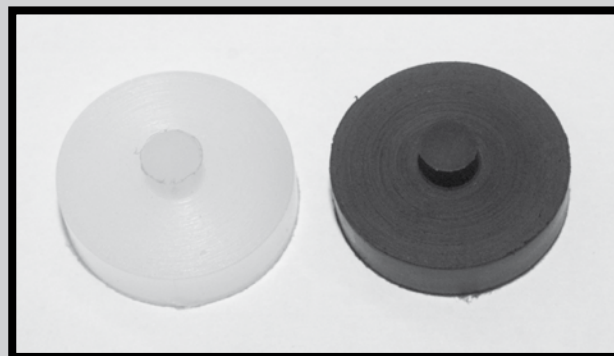
Zastosowane plazmowe systemy wytwarzania warstw umożliwiły uzyskanie jednolitych pokryć na całej powierzchni próbki. Dla przykładu na RYS. 3 zaprezentowano widok próbki niepokrytej i pokrytej warstwami na bazie węgla. W technikach plazmowych szczególnie dużo problemów stwarza wytwarzanie warstw na nietypowych kształtach próbek, jednak w opisywanym przypadku odpowiednio dobrane parametry procesu pozwoliły zakończyć ten etap badań powodzeniem.

Jednorodna warstwa na całej powierzchni jest podstawowym kryterium, które muszą spełniać pokrycia implantów. Uzyskane w ten sposób zmodyfikowane podłoża zostały poddane badaniom zwilżalności (RYS. 4). Okazało się, że wytworzone na powierzchniach polimerów warstwy powodują podwyższenie wartości kąta zwilżania, co sugeruje zmianę ich właściwości w stronę hydrofobową, przy czym o właściwościach hydrofobowych można mówić jedynie w przypadku modyfikacji powierzchni za pomocą plazmy MW/RF (RYS. 5).



RYS. 4. Kąt zwilżania dla próbki UHDPE.
FIG. 4. Wetting angle of UHDPE sample.

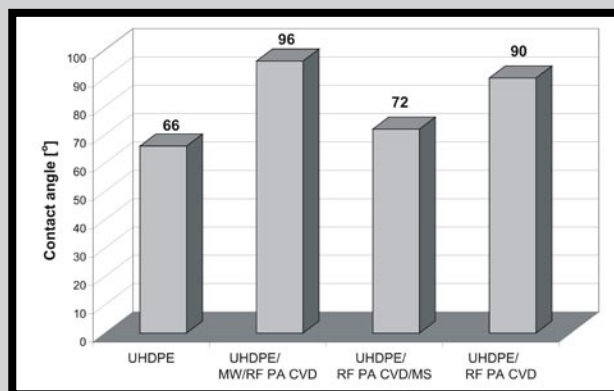
Najważniejszym badaniem charakteryzującym mechaniczną odporność wytworzonych warstw na bazie węgla były testy trybologiczne, których wyniki zaprezentowano na RYS. 6. Wszystkie zastosowane modyfikacje znacząco wpłynęły na wartość współczynnika tarcia. Najbardziej obiecujące rezultaty uzyskano dla warstw wytworzonych metodami MW/RF PA CVD oraz RF PA CVD/MS. Jak widać na wykresie 6 współczynnik tarcia dla niezmodyfikowanego UHDPE kształtował się na poziomie około 0,42, po modyfikacji wynosił od odpowiednio: około 2,2 dla warstw węglowych wytworzonych metodą RF PA CVD oraz około 0,11 dla pozostałych modyfikacji. Interesujący jest przebieg współczynnika tarcia dla warstw wytworzonych metodą MW/RF PA CVD. W początkowym okresie rośnie on do dość znaczących wartości aby po pewnym czasie spaść dążąc do stałego poziomu około 0,11. Ten początkowy skok może świadczyć o zachodzących procesach docierania się trzpienia i dysku stalowego i nie ma on w późniejszym przebiegu testu żadnego negatywnego wpływu. Analizując przedstawione rezultaty, za najbardziej optymalną w wykończonym węźle tarcia modyfikację powierzchni UHDPE należy uznać modyfikację warstwami na bazie węgla i tytanu. Jak dowodzą nasze wcześniejsze badania warstwy takie charakteryzują się znakomitymi właściwościami trybologicznymi [11], a także stanowią doskonałe zabezpieczenie przeciwkorozyjne [12]. Mogą być one doskonałą alternatywą dla innych warstw wykorzystywanych do modyfikacji powierzchni UHDPE.



RYS. 3. Widok próbki pokrytej i niepokrytej warstwami węglowymi.

FIG. 3. View of the UHDPE samples: covered and non covered carbon coatings.

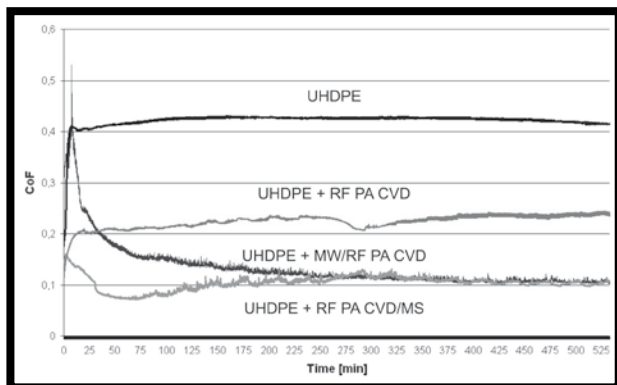
Homogenous layer on the surface is the main criterion, which has to be fulfilled by the coatings used for medical implants protection. Such modified surfaces were subjected to wettability investigations (FIG. 4). As the result of the investigation it was noticed that layers manufactured on the polymers' surfaces increase the contact angle, which means that after the modification the substrate properties were changed into more hydrophobic direction, however the hydrophobic nature of the coating was observed only for the modification with the use of MW/RF plasma (FIG. 5).



RYS. 5. Wyniki badań kąta zwilżania.

FIG. 5. Contact angle investigation results.

The most important investigations which characterise the mechanical resistance against wear of carbon-based coatings were the tribological examinations, which results are presented in FIG. 6. All applied modifications noticeably influenced the friction coefficient value. The most promising result was obtained for the layers manufactured with the use of MW/RF PACVD and RF PACVD/MS methods. As it is presented in FIG. 6 friction coefficient for non modified UHDPE was about 0,42. After the modification it was 0.22 for the layers sythetised with the use of RF PACVD method and 0.11 for the others respectively. Interesting course of CoF was observed for the layers manufactured with the use of MW/RF PACVD method. At the beginning its value increased to a high value and next it decreased to a constant level of 0.11. High CoF observed at the beginning of the test seems to be a reason of the adaptation of the pin and steel disc. The analysis of the obtained results indicates that as the most optimal modification of UHDPE for this kind of friction couple, layers based on Ti and C should be taken. Our earlier works prove that titanium based carbon layers manufactured with the use of hybrid RF PACVD/MS technology present also a very promising anticorrosive features.



RYS. 6. Wyniki badań współczynnika tarcia uzyskane metodą pin on disc.

FIG. 6. Friction coefficient vs. time of the test obtained in pin-on-disc method.

Wnioski

Przeprowadzone badania nad modyfikacją powierzchni UHDPE z wykorzystaniem technik plazmowych dowodzą znakomych właściwości trybologicznych warstw na bazie węgla. Jako najbardziej optymalne w założonym węzle tarcowym rozwiązanie wytypowano modyfikację powierzchni UHDPE warstwami na bazie węgla i tytanu. Niemniej jednak równie obiecujące wyniki uzyskano z modyfikacji powierzchni polimeru metodą MW/RF PA CVD. Wszystkie przedstawione wyniki stanowią bardzo ważne źródło informacji o możliwościach zastosowania warstw na bazie węgla w produkcji nowoczesnych elementów stawów biodrowych czy kolanowych. Aktualnie prowadzone badania zmodyfikowanych polimerów mają dać jasną odpowiedź jaki wpływ mają nowo stworzone kompozyty na nasz organizm. Dopiero wykonane i przeanalizowane badania biologiczne mogą definitywnie potwierdzić ich przydatność w medycynie.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu N507 174 32/1697.

Piśmiennictwo

- [1] S. Mitura, E. Mitura, A. Mitura: "Manufacture of amorphous carbon layers by r.f. dense plasma CVD", *Diamond and Related Materials* 4 (1995), pp 302-303.
- [2] S. Mitura, A. Mitura, P. Niedzielski, P. Couvrat: "Nanocrystalline diamond coating", *Nanotechnology in Materials Science*, Pergamon Press, Elsevier 2000, pp. 2165-2176.
- [3] K. Bąkiewicz, S. Mitura: "Biocompatibility of NCD", *Journal of Wide Bandgap Materials* 9 (2002), pp 261-272.
- [4] Jakubowski W, Bartosz G, Niedzielski P, Szymański W, Walkowiak B, "Bacterial colonization of nanocrystalline diamond surface", *Diamond Related Materials* 2004 13(10), pp 1761-1763.
- [5] Ohgoe Y., Hirakuri K. K., Tsuchimoto K., Friedbacher G.: "Uniform deposition of diamond-like carbon films on polymeric materials for biomedical applications", *Surface and Coatings Technology*, Vol. 184, 2-3, (2004), pp. 263-269.
- [6] Trakhtenberg I.Sh., Bakunin O.M., Korneyev I.N., Plotnikov S.A., Rubshtein A.P., Lemura K.: "Substrate surface temperature as a decisive parameter for diamond-like carbon film adhesion to polyethylene substrates", *Diamond and Related Materials* Vol. 9, 3-6, (2000), pp. 711-714.

Taking into consideration results of the investigation it can be stated that the gradient carbon coatings a-C:H/Ti can be a very good protection against wear [11] and corrosion processes occurred in aggressive environment of human body [12]. They can be an alternative for other technologies used for modification of UHDPE surfaces.

Conclusions

Conducted examinations concerning modification of UHDPE surface with the use of plasma techniques prove very good tribological properties of carbon-based layers. As the optimal modification for this kind of friction couple titanium and carbon based layers has been chosen. However also very promising result was obtained for the MW/RF PACVD modification method. All presented results of investigation are a very important source of the information concerning the possibilities of application of carbon-based layers in production of modern elements of hip and knee prosthesis. Actual examinations of modified polymers will give a clear answer about what kind of the influence have the newly designed composites on our organism. Biological examinations and their interpretation will definitely confirm their usability in medicine.

Acknowledgments

This work has been supported by the Ministry of Scientific Research and Information Technology under grant N507 174 32/1697.

References

- [7] M.R. Wertheimer, H.R. Thomas, M.J. Perri, J. Klemberg-Sapieha, L. Martinu: "Plasmas and polymers: From laboratory to large scale commercialisation", *Pure and Appl. Chem.* 68 (1996), pp. 1047-1053.
- [8] L. Martinu, D. Poitras: "Plasma deposition of optical films and coatings: A review", *Journal of Vacuum Science and Technology A* 18 (2000), pp. 2619-2645.
- [9] R. Hauert: "A review of modified DLC coatings for biological applications", *Diamond and Related Materials* 12 (2003), pp. 583-589.
- [10] Jan Burcan, Janusz Cwanek, Monika Gierzyńska-Dolna, Mieczysław Korzyński - „Bio-tribological aspects of lubrication of the basis of endoprosthesis of human hip joint – *Tribology* 4 (148), 1996, pp. 338-353.
- [11] M. Clapa, D. Batory: „Improving adhesion and wear resistance of carbon coatings using Ti:C gradient layers”, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, Vol. 20, 1 – 2, 2007 pp. 415 – 418.
- [12] D. Batory, T. Błaszczak, M. Clapa, S. Mitura: „Investigation of anti-corrosion properties of Ti:C gradient layers manufactured in hybrid deposition system” *Journal of Materials Science* Vol. 43, 10, 2008, pp. 3385-3391.

OCENA STANU BIŻUTERII METALICZNEJ Z POWŁOKĄ WĘGLOWĄ W BADANIACH IN VIVO

DOROTA BOCIAGA

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA
E-MAIL: DOROTA.BOCIAGA1@GMAIL.COM

Streszczenie

Tworzywa metaliczne stanowią szeroką gamę produktów, które służą człowiekowi w każdym aspekcie życia. Odpowiednie właściwości biologiczne oraz optymalne parametry biomechaniczne sprawiają, iż tworzywa metaliczne są wciąż bardzo szeroko stosowane. Są to nie tylko wyroby o charakterze mechanicznym. Równie istotne są te wykorzystywane na biomateriały, które posiadają zespół cech zapewniających im jak największą biogodność i biofunkcjonalność. To właśnie z biomateriałów wykonuje się produkty, z którymi organizm ludzki ma kontakt bezpośredni, takie jak: implanty medyczne, narzędzia chirurgiczne, czy wyroby jubilerskie, które bardzo powszechnie ozdabiają niemal każdą część ludzkiego ciała. Biżuteria przeznaczona do zdobienia ciała to szczególnie rodzaj tworzyw metalicznych.

Ozdoby, będące wyrobami metalicznymi, mają bezpośredni kontakt z żywą tkanką. Stanowią zatem swego rodzaju biomateriały, które powinny spełniać wymogi im adekwatne. Jednak wstępne badania i doniesienia literaturowe wskazują, że nawet biomateriały, powszechnie uważane za nietoksyczne i bezpieczne dla organizmu, mogą uwalniać jony pierwiastków składowych podłoża, wpływając na utrudniony proces gojenia się ran, inicjując odczyny alergiczne, mogą także odkładać się w narządach wewnętrznych (metalozę) a przez to prowadzić do upośledzenia czynności komórek organizmu.

Niniejsza praca jest krótkim przeglądem stanu wiedzy w zakresie wyrobów jubilerskich używanych do zabiegów zdobienia ciała oraz weryfikacją oddziaływania organizmu żywego na ozdoby z tworzyw metalicznych z powierzchnią modyfikowaną powłokami węglowymi.

Słowa kluczowe: jubilerskie tworzywa metaliczne, biomateriały, powłoki węglowe, badania in vivo

[Inżynieria Biomateriałów, 76, (2008), 28-32]

Wprowadzenie

Tworzywa metaliczne stanowią szeroką gamę półproduktów, z których wytwarza się gotowe wyroby do zastosowań w niemal każdej dziedzinie. Specyficzną grupę materiałów wykonywanych z tworzyw metalicznych stanowią biomateriały. Są one wynikiem prac badawczych interdyscyplinarnych zespołów i stanowią efekt zaawansowanych technologii. Badania nad rozwojem różnego rodzaju metali i stopów do zastosowań medycznych zmierzają w kierunku rozwiązań opartych na materiałach coraz bardziej złożonych, czy to na poziomie atomowym,

EVALUATION OF THE SURFACE OF METALLIC JEWELLERY WITH CARBON COATING AFTER IN VIVO TEST

DOROTA BOCIAGA

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, INSTITUTE OF MATERIALS
SCIENCE AND ENGINEERING, BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION
1/15 STEFANOWSKIEGO ST., 90-924 LODZ, POLAND
E-MAIL: DOROTA.BOCIAGA1@GMAIL.COM

Abstract

The metallic materials make a wide spectrum of products, which are useful for people in any aspect of life. Suitable biological properties and optimal biomechanical parameters make, that metallic materials are still very broadly applied. Those are not only mechanical products. Also these, which are used as a biomaterials, are very important for the sake of biocompatibility and bio-functionality. Articles staying in a direct contact with living organism, like for example: medical implants, surgical tools or jewellery, which decorates almost each part of human body, should be made of biomaterials. Jewellery is a special kind of metallic materials. They have a contact with tissues and thus constitute a special kind of biomaterials, which should fulfil the requirements adequate for them. The preliminary research and literature reports show that even biomaterials, generally pointed as non-toxic and safe, can release ions of background's elements and thus influence the wound healing process making it more difficult, initiate the allergic response or cause the metalosis.

Present work is a short review of state of the art in the range of jewellery being in use as materials for body modification procedures. It is also a verification of interaction between living organism and metallic materials with carbon coating on the surface.

Keywords: jewellery metallic materials, biomaterials, carbon coatings, in vivo investigation

[Engineering of Biomaterials, 76, (2008), 28-32]

Introduction

Metallic materials present a wide range of semi-finished articles, which are used in order to produce finished products almost in all disciplines. A very specific group of metallic materials constitute biomaterials, which are a result of work of interdisciplinary teams of scientists and constitutes effect of advanced technologies.

The examinations of development of various kinds of metals and alloys for the medical application head for direction of solutions based on more and more complex materials, both at the atomic and macroscopic level. What's more, their surfaces are modified by elements or compounds of metals or non-metals, like the carbon, hydroxyapatite, titanium or teflon coatings.

Biomaterials constitute a very specific group of materials characterized by a various compound, build and properties outstanding a very specific features making that they are acceptable by the human organism [1]. The system biomaterial-tissue-body fluid should be comprehended as a functional unity.

czy makroskopowym, których powierzchnie modyfikowane są pierwiastkami lub związkami z grupy zarówno metali, jak i niemetali, takimi jak np. powłoki węglowe, hydroksyapatytowe, tytanowe czy teflonowe. Biomateriały stanowią charakterystyczną grupę materiałów o różnym składzie, budowie i właściwościach, wyróżniających się tą specyficzną cechą, że są akceptowane przez organizm ludzki [1]. Układ biomateriał-tkanka-płyn ustrojowy powinien być pojmowany jako funkcjonalna jedność.

W praktyce klinicznej zastosowanie biomateriałów wiąże się zatem z rozwiązaniem takich problemów i zagrożeń, jak: toksyczność, kompatybilność biologiczna, gojenie tkanek, właściwości mechaniczne i zmęczenie materiałów oraz zagadnienia prawne. Od właściwości biomateriału zależy nasilenie odpowiedzi tkankowej i humoralnej organizmu a w konsekwencji czas prawidłowego funkcjonowania produktu.

Obecnie biomateriały z tworzyw metalicznych wykorzystywane są w głównej mierze w ortopedii, stomatologii, chirurgii szczękowej, kardiochirurgii, neurochirurgii, chirurgii plastycznej, laryngologii, na instrumentarium chirurgiczne, jak również do produkcji wyrobów jubilerskich.

Najpopularniejszym materiałem stosowanym na ozdoby ciała jest stal medyczna, srebro, złoto, tytan. Jednak wobec braku precyzyjnych przepisów wykonawczych w tej dziedzinie, na rynku spotkać można ozdoby wykonane również z cynku, miedzi z dużą zawartością niklu [2], powierzchniowo chromowane, które właściwie nie spełniają żądanych norm biomedycznych.

Metale szlachetne jak złoto (Au), srebro (Ag) czy platyna (Pt) (również inne platynowce: iryd, pallad, rod), dzięki swoim właściwościom leczniczym znalazły zastosowanie również w medycynie. Srebro stosowane jest głównie w stomatologii do wypełniania ubytków, złoto w kosmetologii, zaś platyna ma szerokie spektrum działania w onkologii [3].

Pomimo pozytywnego działania metale szlachetne lub ich pochodne wykazują również zdolności toksyczne. Choć znane są ich właściwości biostymulujące, w większości przypadków ich metaboliczna funkcja nie jest znana. Wiadomym jest, iż ze zmniejszeniem zawartości metali szlachetnych w stopach obniża się ich odporność korozyjna. Jednak względy ekonomiczne sprawiły, że poza metalami szlachetnymi wykorzystuje się w jubilerstwie również stopy innych metali. W głównej mierze są to stale Cr-Ni-Mo o strukturze austenitycznej oraz stopy tytanu. Stanowią one alternatywę dla drogiego złota czy też platyny. Materiały te zaczerpnięte zostały z gamy stopów do zastosowań w inżynierii biomedycznej, gdyż środowisko pracy zarówno w przypadku implantów medycznych jak i wyrobów jubilerskich stanowi tkanka żywa oraz płyny ustrojowe.

Względy ekonomiczne decydują również o fakcie, że w praktyce jubilerskiej stopy tytanowe stosowane są znacznie rzadziej niż stopy metali nieszlachetnych typu Cr-Ni-Mo oraz stopy kobaltu. Spośród tańszych materiałów stal chirurgiczna typu 316L jest najbardziej rozpowszechnionym materiałem na biżuterię do zabiegów modyfikacji ciała (z ang. *body art*). Stal ta, powszechnie nazywana nierdzewną, charakteryzuje się jednak słabą odpornością korozyjną w obecności agresywnego środowiska płynów ustrojowych. Zawiera dość znaczne ilości niklu (w zależności od typu zaw. Ni wynosi odpowiednio od 13% do 15%), który może powodować podrażnienia po uwolnieniu w wyniku wystąpienia korozji.

Prowadzone badania i doniesienia literaturowe wskazują, że nawet materiały powszechnie uważane za nietoksyczne i bezpieczne dla organizmu mogą uwalniać jony swoich pierwiastków składowych podłoża, wpływając na utrudniony proces gojenia się rany, odkładać w narządach wewnętrznych (metaloza), a przez to prowadzić do upośledzenia czynności komórek organizmu [4,5,6].

In the clinical practice the application of biomaterials is connected with the solution of such problems and threats as toxicity, biological compatibility, mechanical properties and material fatigue and legal aspects. On the biomaterial's properties depends the intensification of tissue and humoral response of the organism and, as a result, the time of proper product functionalisation.

At present, the biomaterials made of metallic materials are used mainly in orthopaedics, dentistry, maxillary surgery, cardio-surgery, neurosurgery, anaplasty, laryngology, for the surgical tools and for the jewellery production as well.

The most popular material being applied for body decoration is medical steel, silver, gold, titanium. Nevertheless, taking into consideration the lack of executive regulations precision in this domain, it is possible to buy on the market decorations made of zinc, copper with a big amount of nickel as well [2], which surfaces are coated by chromium, which do not fulfil any biomedical standards.

Noble metals like gold (Au), silver (Ag) or platinum (Pt) (also other platinoids like: iridium, palladium, rhodium), thanks to their curative properties have found an application also in medicine. Silver is applied mainly in dentistry in order to fulfil the cavity, gold in cosmetology, while platinum has a wide effect spectrum in oncology [3].

In spite of the positive effect, the noble metals and their derivatives show also the toxic abilities. Although the biostimulating properties of the noble metals are known, in most cases their metabolic function keeps still unknown. A low content of noble metals in alloys reduces their corrosion resistance. The economic aspects make that in jewellery are used also alloys of other metals. To a large degree that are austenitic Cr-Ni-Mo steels and titanium alloys. These constitute an alternative for costly gold or platinum. These materials were ladled out from the scale of alloys applied in biomedical engineering for the sake of very similar working environment.

The economical aspects decide also about the fact, that in jewellery practice the titanium alloy are applied more rarely than the noble metals alloys type Cr-Ni-Mo and cobalt alloys. From among cheaper materials the AISI 316L stainless steel is the most widespread material for jewellery using for the body modification procedures (so called *body art*). This steel, commonly called rust-proof, is characterized by a weak corrosion resistance in the aggressive environment of body fluids. Moreover it contains considerable amount of nickel, which can cause irritation after releasing as a result of corrosion.

Conducting examinations and literature reports point that even materials, commonly pointed as non-toxic and safe, can release ions of background's elements and thus influence the wound healing process making it more difficult, accumulate in the internal organs (the metalosis) and thus lead up to an defect of cells activity [4,5,6]. It is also known that material can activate in cells the synthesis of inflammatory reaction's transmitters. That makes impossible its lasting stay in organism. This phenomenon can be also a reason of inflammatory reaction development without the infectious factors.

The PACVD techniques (*Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition*) are famous for the good adhesion of coatings manufactured using these methods. Simultaneously, the exact parameters steering let control both the thickness of coatings and their structure. The specific physicochemical and mechanical properties of carbon coatings modifying the surfaces of metals and alloys make that they are very useful material for application in industry, medicine and bioengineering [7,8]. These coatings are one of the best biocompatible materials introducing the least unfavourable changes in living system. Moreover, the examinations in

Wiadomo również, że materiał może aktywować w komórkach syntezę mediatorów reakcji zapalnej, co uniemożliwia jego długotrwale przebywanie w organizmie. Zjawisko takie może być przyczyną rozwoju reakcji zapalnych bez udziału czynników infekcyjnych.

Techniki PACVD (z ang. *Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition*) znane są z tego, że nałożone warstwy posiadają doskonałą adhezję do podłoża. Jednocześnie dokładna kontrola parametrów procesu pozwala na łatwe sterowanie tak grubością warstw, jak i ich strukturą. Specyficzne właściwości fizykochemiczne i mechaniczne powłok węglowych modyfikujących powierzchnię metali i stopów sprawiają, iż są bardzo użytecznym materiałem dla zastosowań w przemyśle, medycynie i bioinżynierii [7,8]. Warstwy te są jednym z najlepiej tolerowanych materiałów, wprowadzającym najmniej niekorzystnych zmian w ustroju. Ponadto badania w zakresie węglowych powłok ochronnych na implantach medycznych dowodzą, iż mogą one stanowić barierę dla jonów metali uwalnianych w procesach korozyjnych chroniąc tym samym przed ich przenikaniem do organizmu. Dodatkowym atutem warstwy jest jej dekoracyjny charakter. Powłoki węglowe wydają się zatem być doskonałym materiałem do rozwiązania problemów powikłań związanych z jubilerskimi tworzywami metalicznymi, co potwierdziły wcześniejsze badania *in vivo* przeprowadzone na szczurach laboratoryjnych z wykorzystaniem wyrobów jubilerskich modyfikowanych metodami PA CVD [9].

Materiały i metodyka

W badaniach jako podłoża użyto austenitycznej stali chirurgicznej AISI 316L. Wybór podłoża podyktowany był faktem, iż stal ta jest obecnie najbardziej rozpowszechnionym tworzywem metalicznym do wyrobu ozdób używanych w modyfikacji ciała. Poza tym, jako że od dawna stosowana jest w medycynie, została dobrze poznana pod kątem zachowania w środowisku biologicznym. Próbkę stanowiła oryginalna biżuteria powszechnie używana do zabiegów ozdabiania ciała – kolczyki (typ: sztanga) o średnicy kulek 6mm, średnicy pręcika 1,6mm, długości pręcika 30mm.

Do zmodyfikowania powierzchni biżuterii wykorzystano dwie metody chemicznego osadzania z fazy gazowej: RF PACVD wykorzystująca wyładowanie wysokiej częstotliwości oraz MW/RF PACVD z zastosowaniem plazmy dwuczęstotliwościowej MW/RF. Zastosowanie tych dwóch metod dało możliwość regulacji właściwości fizykochemicznych nanoszonych warstw, a tym samym pozwoliło na wskazanie metody właściwej do tego typu zastosowań.

Do przeprowadzenia badań *in vivo* wykorzystano 100 dwumiesięcznych szczurów płci męskiej o wadze 200÷250 g stada niekrewniaczego outbred o symbolu Imp. WIST. Zwierzętom jednorazowo zaimplantowano biżuterię metaliczną modyfikowaną i niemodyfikowaną w tkankę podskórną grzbietową okolicy międzyłopatkowej. Eksperyment prowadzony był w czterech interwałach czasowych: 24 godziny, 1 tydzień, 4 tygodnie i 26 tygodni, co pozwoliło na ocenę skutków implantacji krótko- i długoterminowej (zgodnie z normą PN-EN 30993-6). Po tym czasie wycinano ozdoby wraz z otaczającą tkanką (RYS. 1a).

Po zakończonym eksperymencie w modelu *in vivo* wyjęte ze szczurzych tkanek kolczyki (RYS. 1b) poddano obserwacji używając elektronowej mikroskopii skaningowej. Oceniano morfologię powierzchni ozdób po różnych okresach kontaktu ozdób ze środowiskiem tkankowym.

the field of protective carbon coatings onto the medical implants proof that they can constitute a barrier against metal ions releasing in the corrosion processes. Contact of body tissues with carbon coating means no metal ions exempted and thus no metalosis nor allergic reaction. So the carbon coatings seem to be a good material to solve complications connected with jewellery, what the *in vivo* tests had proofed [9].

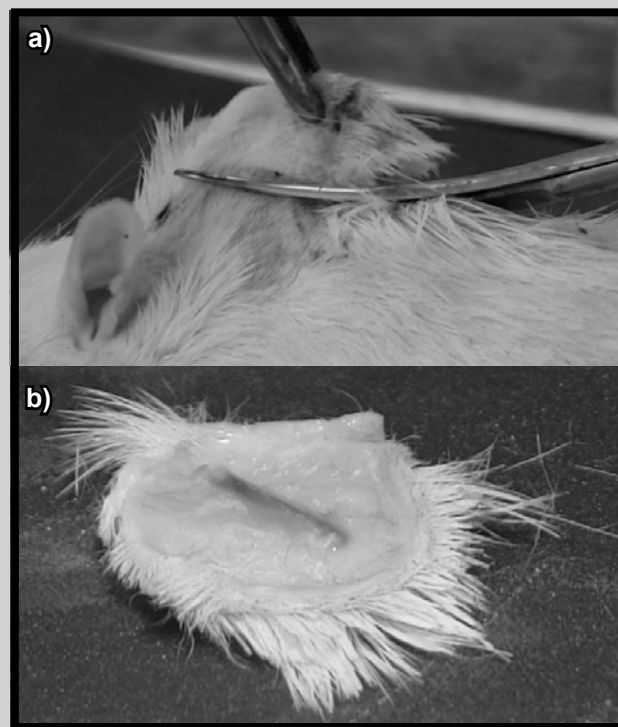
Materials and methods

Earrings, applying in practice (the weight type), made of 316L stainless steel (balls diameter – 6 millimeters, stamen diameter – 1,6 millimeters, length of stamen – 30 millimeters) were modified by carbon coatings. The choice of such kind of basis have taken a place because the statistical examinations show that 316L stainless steel is still very commonly apply in medicine as well as in body piercing salons.

Two methods of PACVD were used for this purpose: radio frequency (RF) and microwave/radio frequency (MW/RF). Application of these two methods gave a possibility of the coated layers physiochemical properties control and thereby let point a better method.

In order to conduct the *in vivo* test the population of 100 male rats of inbred farm, WISTAR stirps in age of 2 months and weight about 210÷220 grammes were used. The modified and non-modified jewellery was implanted into adult male rats subcutaneously. Experiment was being conducted for 24 hours, 1 week, 4 weeks and 26 weeks, what gave a possibility to evaluate the results of short- and long-term implantation (according to the norm EN-30993-6). After the periods of test the implants with surrounding tissues have been taken out (FIG. 1a).

After the end of *in vivo* experiment, the jewellery harvested from rats' tissues (FIG. 1b) have been taken under observation with use of scanning electron microscopy. The morphology of jewellery's surface was estimated.



RYS. 1. Zabieg pobrania tkanki okołointplantowej wraz z wyrobem jubilerskim (a), pobrany wyrób jubilerski wraz z tkanką (b).

FIG. 1. The procedure of implant surrounding tissue collecting (a), collected jewellery (b).

Wyniki i dyskusja

Ocena powierzchni jubilerskich tworzyw metalicznych wyjętych ze szczurów pokazała wysoce zadowalające wyniki w aspekcie oddziaływania organizmu żywego z naniesionymi powłokami węglowymi. Powłoki węglowe nawet po 26 tygodniach przebywania w środowisku tkankowym nie wykazywały delaminacji ani śladów korozji (RYS. 2b,c). Na powierzchni ozdób bez powłok obserwowano liczne wżery korozyjne, które pojawiały się już po 1 tygodniu przebywania w otoczeniu tkanki żywej (RYS. 2a). Wyniki obserwacji przedstawiono na RYS. 2. Na powierzchniach widoczne pozostałości tkankowe.

Określenie skutków oddziaływania jubilerskich wyrobów metalicznych wykonanych ze stali AISI 316L ze środowiskiem biologicznym pozwoliło na weryfikację zagrożeń płynących z ich implantacji oraz użytkowania. Otrzymane wyniki dla ozdób bez naniesionych powłok porównano z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu biżuterii z ochronną powłoką węglową, aby ocenić skuteczność zaproponowanego rozwiązania.

Wnioski

Powłoki węglowe zajmują szczególne miejsce wśród materiałów o dobrej tolerancji biologicznej w środowisku tkankowym, a ich biogodność została szeroko opisana w literaturze. Wytworzone na biomateriale w sposób optymalnie do niego dopasowany, pozwalają uzyskać produkt biokompatybilny oraz biofunkcjonalny, uzupełniając swoimi właściwościami listę wymagań, których samo tworzywo metaliczne nie jest w stanie w pełni zagwarantować.

Uzyskane wyniki dowodzą, iż powłoki węglowe są doskonałym materiałem do rozwiązania problemów związanych z negatywnym oddziaływaniem jubilerskich wyrobów metalicznych na organizm. Spełniają one swoje funkcje ochronne również przy zastosowaniach długoterminowych.

Results and Discussions

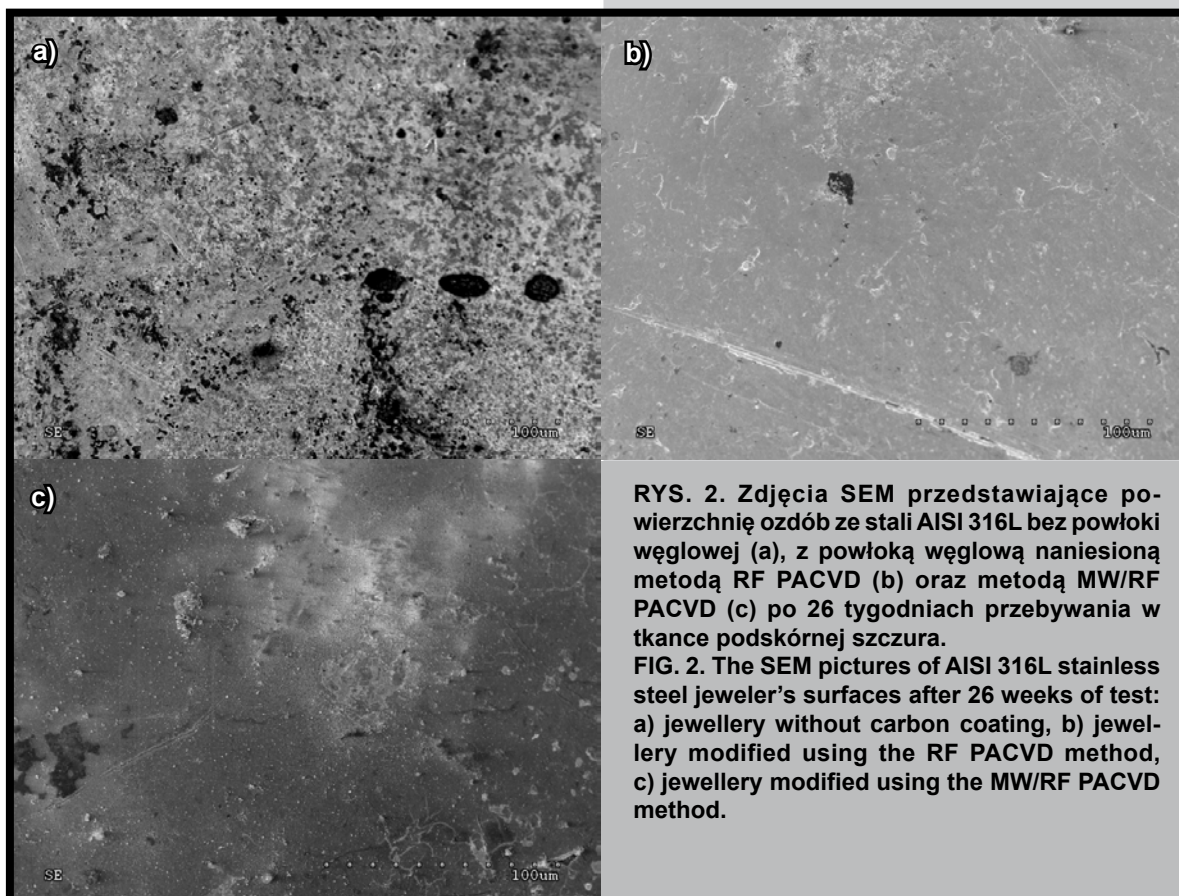
The estimation of surfaces of metallic jewellery harvested from rats has shown very satisfactory results taking into consideration the interactions between living organism and carbon coatings. After 26 weeks of being in tissue environment, the carbon films did not reveal a delamination nor corrosion traces (FIG. 2b,c). On the surface of decorations without coatings numerous pits were observed. These have showed up very fast - after one week staying in contact with living tissue (FIG. 2a). The observation results presents FIGURE 2. The tissues' rests are visible on the samples' surfaces.

Qualification of effects of jeweller's metallic material made of AISI 316L stainless steel on the biological environment let estimate their implantation and use threats. The results we have obtained for decorations without carbon coatings were compared with results we've got for modified jewellery. That let assess the effectiveness of proposed technological solution.

Conclusions

The carbon coatings have a special position among materials which show a good biological tolerance and their biocompatibility was widely described in literature. Carbon films manufactured onto the biomaterial in the perfectly matched way let get the bio-functional and biocompatible product, which complete the list of requirements the metallic material is not able to assure.

The obtained results prove that carbon coatings are a very good material in order to solve problems with negative interaction of jeweller's metallic materials with the organism. They keep their protective functions also in long-term applications.



RYS. 2. Zdjęcia SEM przedstawiające powierzchnię ozdób ze stali AISI 316L bez powłoki węglowej (a), z powłoką węglową naniesioną metodą RF PACVD (b) oraz metodą MW/RF PACVD (c) po 26 tygodniach przebywania w tkance podskórnej szczura.

FIG. 2. The SEM pictures of AISI 316L stainless steel jeweler's surfaces after 26 weeks of test: a) jewellery without carbon coating, b) jewellery modified using the RF PACVD method, c) jewellery modified using the MW/RF PACVD method.

Piśmiennictwo

- [1] Nałęcz, M.: „Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000“, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa, 2003.
- [2] Bociąga, D., Grabarczyk, J., Niedzielski, P., Krakos, M., Mitura, K.: „Zastosowanie biomateriałów z warstwami węglowymi do przekłuwania ciała“, Inżynieria Biomateriałów, 43-44, 2005, pp 66-70.
- [3] Żelazowska, R., Pasternak, K.: „Metale szlachetne: srebro (Ag), złoto (Au), platyna (Pt) w biologii i medycynie“, BROMAT CHEM TOKSYKOL - XL. 2007;2, pp 205-209.
- [4] Dąbrowska, D., Roszkiewicz, J., Sosnowski, G., Wójcik, T.: „Alergia na metalowe wszczepy stosowane w ortopedii“, Postępy Dermatologii i Alergologii, XXIV(2), 2007, pp 99-103.
- [5] Hanawa, T.: “Metal ion release from metal implants”, Materials Science & Engineering, C24,2004, pp 745-752.
- [6] Rezzani, R., Rodella, L., Tartaglia, G.M., Paganelli, C., Sapelli, P., Bianchi, R.: “Mast cells and the inflammatory response to different implanted biomaterials”, Arch Histol Cytol., 67(3), Sep 2004, pp 211-217.

References

- [7] Bąkowicz, K., Jakubowski, W., Okroj, W., Walkowiak, B., Karczewska, A., Niedzielski, P., Mitura S.: „Biocompatibility of NCD coatings“ In: Schürer A.D.-R.a.C., ed. Surface Engineering of Biomaterials-Properties, Processing and Potentials of Carbon Coatings: Wiley Verlag 2003.
- [8] Niedzielski, P.: „Wytwarzanie warstw nanokrystalicznego diamentu na potrzeby medycyny“, Praca doktorska. Politechnika Łódzka; Łódź 1998.
- [9] Bociąga, D., Mitura, K.: „Biomedical effect of tissue contact with metallic material using for body piercing modified by DLC coatings“, Diamond & Related Materials, Vol. 17, 2008, 1410-1415.

Errata

W artykule: T. Cieślík, M. Adwent, J. Chłopek, A. Morawska-Chochół, M. Cieślík, J. Majcherczyk „Ocena wpływu kompozytów P(LLA/GA) z włóknami węglowymi oraz P(LLA/GA) z fosforanem trójwapniowym na proces gojenia tkanki kostnej - badania *in vivo* na podstawie wybranych parametrów” (Numer 81-84, (2008), 21-24) należy dodać:

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N403/046/32/2419).

Errata

In article: T. Cieślík, M. Adwent, J. Chłopek, A. Morawska-Chochół, M. Cieślík, J. Majcherczyk „The influence of P(LLA/GA) with carbon fibers and P(LLA/GA) with tricalcium phosphate composite materials on the processes of bone healing - *in vivo* studies based on chosen parameters” (Number 81-84, (2008), 21-24) it is necessary to add:

Acknowledgements

This work was financially supported by Polish Ministry of Science and Higher Education (N403/046/32/2419).